



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

ULB

Die Rolle der Sphingosinkinase 2 in der Pathogenese gefäßproliferativer Netzhauterkrankungen

Eresch, Jeanette
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00012225>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Attribution Share-alike

Publikationstyp: Ph.D. Thesis

Fachbereich: 10 Department of Biology

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/12225>



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Die Rolle der Sphingosinkinase 2 in der Pathogenese
gefäßproliferativer Netzhauterkrankungen

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
vorgelegte

Dissertation

von **Jeanette Eresch**

aus Heidelberg

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Waltraud Pfeilschifter

Darmstadt 2020

Jeanette Eresch: Die Rolle der Sphingosinkinase 2 in der Pathogenese gefäßproliferativer
Netzhauterkrankungen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-122253

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2020

Veröffentlichung unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gefäßproliferative Netzhauterkrankungen.....	1
1.1.1 Die Frühgeborenenretinopathie	1
1.2 Die Mausretina als Angiogenese Modell	4
1.2.1 Physiologische Angiogenese in Mensch und Maus.....	4
1.2.2 Pathologische Angiogenese.....	6
1.2.3 Sauerstoff-induziertes Retinopathie Modell	7
1.3 Angiogene Wachstumsfaktoren	8
1.3.1 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	8
1.3.2 Angiopoietine (Angpt).....	10
1.4 Sphingolipide	11
1.4.1 Struktur.....	12
1.4.2 Metabolismus	13
1.4.3 Das Sphingolipidgleichgewicht.....	14
1.4.4 Sphingosin-1-Phosphat (S1P).....	15
1.4.5 Sphingosinkinasen	17
1.4.6 S1P-Rezeptoren.....	20
1.4.7 Retinale Sphingolipidzusammensetzung	22
1.4.8 S1P in der Retina	22
1.5 Zielsetzung	25
2. Material und Methode.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.2 Tierexperimentelle Durchführung und Präparation	27
2.1.2.1 <i>Medikamente und Lösungen</i>	27
2.1.2.2 <i>Operationsbesteck</i>	27
2.1.3 Molekularbiologie	27
2.1.3.1 <i>Verwendete Kits und Enzyme</i>	27
2.1.3.2 <i>Taqman® -Lösungen und Sonden</i>	28
2.1.3.3 <i>Sonstige Lösungen</i>	28
2.1.4 Histologie.....	28
2.1.4.1 <i>Antikörper</i>	28
2.1.4.2 <i>Sonstige Lösungen</i>	29
2.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen	29
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.7 Geräte	30
2.1.8 Computersoftware	30
2.2 Methode.....	31
2.2.1 Versuchstiere	31
2.2.1.1 <i>C57BL/6J Mäuse (WT)</i>	31
2.2.1.2 <i>Sphk2 knockout Mäuse (Sphk2^{-/-})</i>	31

2.2.1.3	<i>EllaCrexJos5a Mäuse (tgSphk2)</i>	32
2.2.1.4	<i>Genotypisierung</i>	33
2.2.2	Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie	34
2.2.2.1	<i>Entnahme der Gewebeproben</i>	36
2.2.2.2	<i>Entnahme der Blutproben</i>	36
2.2.3	Histologie	36
2.2.3.1	<i>Retinaflachpräparate: Präparation und Färbung</i>	36
2.2.3.2	<i>Retinaflachpräparate: Bildaufnahme und Auswertung</i>	38
2.2.3.3	<i>Paraffinierung von Mäusen</i>	42
2.2.3.4	<i>Herstellung von Dünnschnittpräparaten</i>	42
2.2.3.5	<i>Immunhistochemie</i>	42
2.2.4	Molekularbiologie	44
2.2.4.1	<i>Retinaprobengewinnung</i>	44
2.2.4.2	<i>Isolierung der Gesamt-RNA</i>	44
2.2.4.3	<i>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA</i>	45
2.2.4.4	<i>cDNA Synthese</i>	45
2.2.4.5	<i>Quantitative Real-time Polymerase Kettenreaktion (Taqman®)</i>	46
2.2.5	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	47
2.2.6	Statistik	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Sphingosinkinasen in der Retina	49
3.1.1	Retinales Vorkommen beider Sphk Isoformen	49
3.1.2	Modulation der Sphk2 in den gentechnisch veränderten Mauslinien	50
3.1.3	Expression der Sphks in den genetisch veränderten Mäusen	51
3.1.4	Einfluss der Sphk2 Modulation auf die Angiogenese	52
3.1.5	Einfluss der Sphk2 Modulation auf die retinale Schichtdicke	53
3.1.6	Einfluss der Sphk2 Modulation auf Sphingolipide in Retina und Plasma	54
3.1.7	Einfluss der Sphk2 Modulation auf die Expression der S1P-Rezeptoren	56
3.1.8	Einfluss der Sphk2 Modulation auf vaskuläre Wachstumsfaktoren	58
3.2	Modulation der Sphingosinkinase 2 im OIR Modell	60
3.2.1	Einfluss der Sphk2 Modulation auf Vaso-Obliteration und Neovaskularisierung	60
3.2.2	Einfluss des OIR Modells auf die Expression der Sphingosinkinasen	63
3.2.3	Sphingolipide im OIR Modell	64
3.2.3.1	<i>Sphingolipide in der Retina von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen</i>	64
3.2.3.2	<i>Sphingolipide im Plasma von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen</i>	65
3.2.4	Retinale S1P-Rezeptorexpression in tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen	66
3.2.5	Vaskuläre Wachstumsfaktoren im OIR Modell	67
3.2.5.1	<i>Einfluss der Sphk2 Modulation auf VEGF</i>	67
3.2.5.2	<i>Einfluss der Sphk2 Modulation auf den Angpt/Tie2 Signalweg</i>	68
4.	Diskussion	70
4.1	Auswirkung der Sphk2 Modulation auf die physiologische Angiogenese	70
4.1.1	Beteiligung der Sphk2 am Sphingolipidgleichgewicht	72
4.1.2	Veränderungen der S1P-Rezeptorexpression durch Sphk2 Modulation	74

4.1.3 Sphk2 beeinflusst die Expression vaskulärer Wachstumsfaktoren	75
4.2 Auswirkung der Sphk2 Modulation auf die pathologische Angiogenese	77
4.2.1 Das Sphingolipidgleichgewicht im OIR Modell.....	78
4.2.2 S1P-Rezeptoren im OIR Modell.....	80
4.2.3 Einfluss der Sphk2 auf vaskuläre Wachstumsfaktoren im OIR Modell.....	81
5. Zusammenfassung.....	84
6. Summary.....	86
7. Appendix	IV
7.1 Abbildungsverzeichnis	IV
7.2 Tabellenverzeichnis	V
7.3 Abkürzungsverzeichnis	VI
7.4 Literaturverzeichnis.....	X
7.5 Publikationen	XXIII
7.5.1 Publikationen aus dieser Arbeit.....	XXIII
7.5.2 Sonstige Publikationen.....	XXIII
8. Danksagung	XXIV
9. Lebenslauf	XXVI
10. Ehrenwörtliche Erklärung	XXVII

1. Einleitung

1.1 Gefäßproliferative Netzhauterkrankungen

In der Augenheilkunde gehören gefäßproliferative Netzhauterkrankungen zu den häufigsten Erblindungsursachen. Pathologisches Gefäßwachstum kann retinal und choroidal (subretinal) die Netzhaut betreffen. Retinale Neovaskularisation (NV) kommt in einer Gruppe von Erkrankungen vor, die als ischämische Retinopathien bezeichnet werden, und unter anderem die diabetische Retinopathie, retinale Venenverschlüsse und die Frühgeborenenretinopathie umfassen. Subretinale bzw. choroidale NV tritt in Erkrankungen der äußeren Retina und der Bruch'schen Membran auf, wie die altersbedingte Makuladegeneration. Auslösender und unterhaltender Faktor dieser Erkrankungen ist eine Ischämie oder Hypoxämie des retinalen Gewebe, welches der NV vorrangeht (Saint-Geniez and D'Amore, 2004).

Die retinale Blutversorgung ist in ihrem Aufbau einzigartig. Ihre Gefäße und vor allem die retinalen Endothelzellen (EC) sind pathologischen Einflüssen gegenüber jedoch anfällig. Um eine ungestörte Neurotransmission und damit die normale retinale Funktion zu gewährleisten, müssen im extrazellulären Raum der retinalen Neuronen ionische Konzentrationen in einem konstanten Bereich aufrechterhalten werden, was durch hochspezifische Barriereigenschaften der EC und des retinalen Pigmentepithels (RPE) erreicht wird. Da die Blutgefäße direkt anterior der äußeren Photorezeptorsegmente enden, besteht die Notwendigkeit eines vaskulären Systems mit hohem Durchfluss nahe der avaskulären äußeren Retina, das sogenannte Choroid, welches in fenestrierten Kapillaren endet um Plasma freien Zugang zum RPE mit seinen epithelialen und endothelialen Funktionen, zu gewährleisten. Diese hohen Anforderungen machen die retinalen vaskulären ECs und das RPE anfällig für Schäden und die Konsequenzen einer Dysfunktion sind beträchtlich (Campochiaro, 2015).

1.1.1 Die Frühgeborenenretinopathie

Die Frühgeborenenretinopathie (ROP) oder retrolentale Fibroplasie, wie sie ursprünglich genannt wurde, ist eine proliferative Gefäßerkrankung, die im Kindesalter zu Erblindungen und Sehbehinderungen führt. Die Inzidenz behandlungsbedürftiger ROP aller ins Screening aufgenommener Frühgeburten beträgt in Deutschland etwa 3%. Die absoluten Zahlen erscheinen gering, die ROP kann jedoch auch heute noch bei betroffenen Kindern, trotz Screeningprogramme und frühen Behandlungsmethoden, wie Laserkoagulation und Anti-VEGF-Therapie, zu Sehbehinderungen für das gesamte weitere Leben führen (Walz et al., 2018). Unbehandelt kann die ROP zur vollständigen Erblindung beider Augen führen, in

weniger schweren Fällen bleibt die Sehschärfe häufig deutlich reduziert. Zu den eindeutigen epidemiologisch identifizierbaren Risikofaktoren gehören Gestationsalter, Geburtsgewicht, Dauer und Intensität einer postnatalen Sauerstoffgabe, jedoch sind auch eine langsame postnatale Gewichtszunahme und verringerte Wachstumshormonspiegel ROP-Prädiktoren (Bashinsky, 2017; Dogra et al., 2017).

Bei Termingeborenen ist die Netzhaut bei Geburt vollständig vaskularisiert, bei Frühgeborenen dagegen wird die strukturierte intrauterine Gefäßentwicklung durch die Umstellung von plazentarer Sauerstoffversorgung auf Lungenatmung und die damit einhergehende postnatale Sauerstoffexposition, unterbrochen. Der vorzeitige Übertritt aus der uterinen Umgebung (ca. 30 mmHg Sauerstoffpartialdruck) zu Raumluft (60 – 100 mmHg Sauerstoffsättigung) führt zu einem relativen Sauerstoffüberangebot für die unreife Netzhaut und damit einer Verringerung der physiologischen Gewebhypoxie, dem Antrieb des retinalen Blutgefäßwachstums (Stahl et al., 2012).

Diese relative Hyperoxie charakterisiert die Phase I der ROP und verzögert die retinale Vaskularisierung bzw. bringt sie ganz zum Stillstand. Eine therapeutische Intervention ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, und auch oft nicht nötig, da in vielen Fällen das verzögerte Gefäßwachstum wieder aufgenommen wird und über die folgenden Lebenswochen die periphere Netzhaut vaskularisiert wird (Bashinsky, 2017).

Im Rahmen der nachfolgenden relativen Hypoxie, ROP-Phase II, kommt es dann zu einer Beschleunigung des Gefäßwachstums. Als Auslöser hierfür wird die Reifung der peripheren Netzhaut angenommen, was in einem erhöhten metabolischen Bedarf resultiert und damit zu einer steigenden Gewebhypoxie führt. Phase II wird durch die Expression Hypoxie-induzierter angiogener Wachstumsfaktoren charakterisiert, die als Antwort auf die insuffiziente Sauerstoffversorgung in den avaskulären Arealen exprimiert werden. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), einer der potentesten angiogenen Modulatoren, spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Gerhardt et al., 2003). Eine gesteigerte VEGF-Expression kann zu extraretinalen Proliferationen führen, also unkontrolliertes Gefäßwachstum in den Glaskörper, dies stellt das pathologische Korrelat der behandlungsbedürftigen ROP dar (Hellstrom et al., 2013; Stahl and Gopel, 2015).

Die ROP lässt sich in fünf Stadien unterteilen (Abb. 1). In Stadium 1 entsteht eine sichtbare helle weiße Linie, die Demarkationslinie, zwischen den Bereichen der Netzhaut, die durch Gefäße versorgt werden und denen in denen die Gefäßbildung gehemmt ist. Abnorme Gefäßverzweigungen führen in Stadium 2 zu einer erhobenen, prominenten Leiste. In Stadium 3 kommt es zu Trübungen und Blutungen aufgrund extraretinaler Proliferationen und einer stärker ausgebildeten prominenten Leiste. Stadium 4 ist eine partielle Amotio retinae, in der sich Randbereiche der Retina teilweise ablösen.

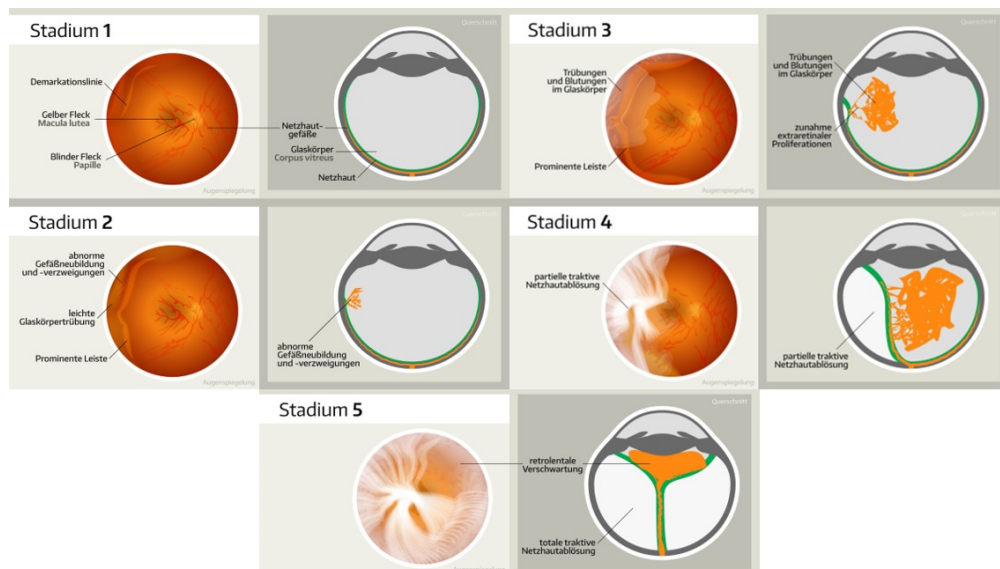


Abb. 1 Die fünf Stadien der Frühgeborenenretinopathie. Stadium 1: Demarkationslinie. Stadium 2: Prominente Leiste. Stadium 3: Prominente Leiste mit extraretinalen Proliferationen. Stadium 4: Partielle Amotio retinae. Stadium 5: Totale Amotio retinae. (https://www.blickcheck.de/wp-content/uploads/2017/04/hi_retinopathia_praematurorum-2.jpg).

Weiterhin kann Stadium 4 in zwei Unterstadien unterteilt werden, je nachdem ob die Makula intakt oder von der Ablösung betroffen ist. Das letzte Stadium ist eine totale Amotio retinae. Die Netzhaut ist in diesem Stadium 5 komplett trichterförmig abgelöst und es kann zu retrolentaler Verschattung (Membranbildung hinter der Augenlinse) kommen (Dogra et al., 2017; Stahl and Gopel, 2015).

Die ROP kann prophylaktisch durch Reduktion der Risikofaktoren wie Langzeitbeatmung und Sauerstoffzufuhr behandelt werden, dies ist bei extremen Frühgeburten jedoch nur begrenzt möglich (Holmstrom et al., 2012). Für die meisten behandlungsbedürftigen Stadien gibt es mit der Laserkoagulation ein etabliertes und sicheres Verfahren mit der sich die Krankheitsaktivität eindämmen lässt. Das Prinzip beruht darauf, dass die peripheren, wachstumsfaktorproduzierenden Netzhautareale verödet werden, womit die VEGF-Expression reduziert und das damit verbundene Fortschreiten der Erkrankung verhindert wird. Mögliche Nebenwirkungen sind narbenbedingte Verziehungen der Netzhaut und hochgradige Kurzsichtigkeit (Stahl and Gopel, 2015).

Mit der anti-VEGF-Therapie gibt es eine medikamentöse Behandlungsalternative. Die langfristigen Effekte einer solchen Therapie bei Frühgeborenen sind bislang jedoch wenig erforscht. Die intravitreale Gabe von Inhibitoren führt zu einer systemischen VEGF Suppression (Sato et al., 2012), wodurch negative Effekte auf das sich entwickelnde Gehirn und andere Organe nicht ausgeschlossen werden können, zumal solche Berichte für die Lunge bereits vorliegen (Wu et al., 2013). Auch Dosierung und Medikamentenwahl sind noch nicht geklärt und werden noch in einer laufenden Studie untersucht (Krohne et al., 2018; Walz et al., 2018).

1.2 Die Mausretina als Angiogenese Modell

1.2.1 Physiologische Angiogenese in Mensch und Maus

Die Angiogenese ist die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen. Gewebe ektodermalen und mesodermalen Ursprungs, wie Retina, Gehirn und Nieren, scheinen vor allem durch Angiogenese vaskularisiert zu werden, im Gegensatz zur Vaskulogenese, dem Blutgefäßwachstum der Embryogenese.

Retinale Vaskularisierung ist mit der Zunahme der Netzhautdicke durch Proliferation, Migration und Differenzierung der neuronalen Zellen assoziiert, da in der noch dünnen avaskulären Retina eine effiziente Sauerstoffverteilung per Diffusion vom Choroid gewährleistet wird. Einhergehend damit ist ein Anstieg der neuronalen Aktivität mit erhöhtem Nährstoff- und Sauerstoffbedarf der reifenden Retina. Die daraus resultierende physiologische Hypoxie führt zu einem örtlichen Anstieg von angiogenen Wachstumsfaktoren, wodurch bereits vorhandene Gefäße destabilisiert werden. Es kommt zur Aktivierung von Perizyten, Astrozyten- und Endothelzellmigration, Proliferation und schlussendlich der Ausbildung eines neuen unreifen Gefäßes. Um nachfolgend die neugeformten Gefäße zu stabilisieren, werden diese durch verschiedene exogene Faktoren remodeliert und reifen (siehe Abb. 2) (Joussen, 2007; Saint-Geniez and D'Amore, 2004).

Die okuläre Gefäßentwicklung erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Phasen und beginnt im Menschen etwa in der 16. Schwangerschaftswoche. Zentrifugal von der Papille ausgehend, wachsen die primitiven retinalen Blutgefäße über die dem Glaskörper zugewandte retinale Oberfläche und bilden das primäre oder auch superfizielle Gefäßnetz (Abb. 3 A), dieses weist einen hierarchischen Aufbau aus Arterien, Venen und Kapillaren auf. Als nächstes wachsen, entlang der Müllerzellen, sekundäre Blutgefäßzweige in die Retina ein und bilden die intermediäre (Abb. 3 B) und tiefe retinale (Abb. 3 C) Kapillarschicht. Die retinalen Plexi sind durch senkrechte Verzweigungen untereinander verbunden, jedoch nicht mit dem choroidalen vaskulären System (Uemura et al., 2006).

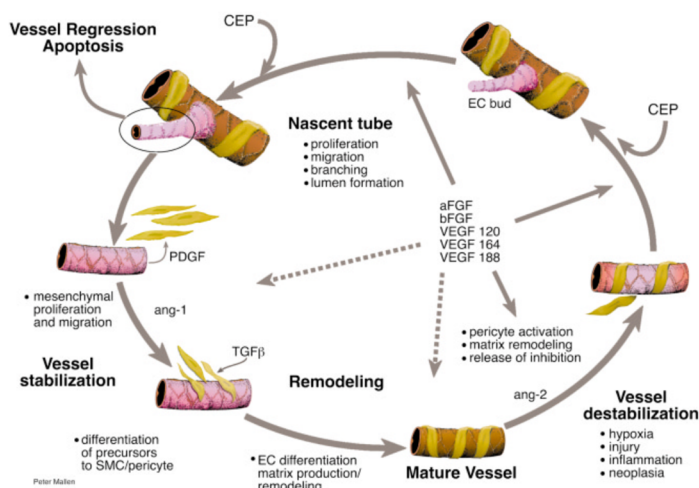


Abb. 2 Schematische Darstellung der Gefäßneubildung. VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; FGF = Fibroblasten Wachstumsfaktor; Ang = Angiopoietin; EC = Endothelzelle; SMC = glatte Muskelzelle; PDGF = platelet-derived growth factor; TGF = transformierender Wachstumsfaktor; CEP = zirkulierender endothelialer Vorläufer. (Saint-Geniez and D'Amore, 2004).

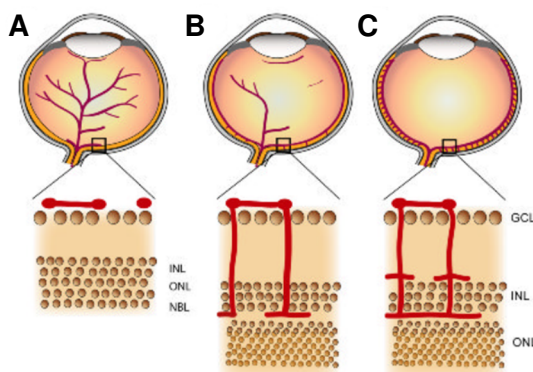


Abb. 3 Retinale Gefäßentwicklung. Die drei aufeinanderfolgenden Phasen der okulären Gefäßentwicklung. **(A)** Bildung des primären / superfiziellen Gefäßnetzes. **(B)** Bildung der intermediären Gefäßschicht. **(C)** Bildung der tiefen retinalen Gefäßschicht. (Ye et al., 2010).

Parallel zur retinalen Gefäßentwicklung werden die fötalen Gefäße im Glaskörper und der posterioren Linsenoberfläche bis zur 34. Schwangerschaftswoche zurückgebildet, zu diesem Zeitpunkt werden dann weite Teile der Netzhaut vom retinalen Gefäßplexus versorgt. Um die 36. Schwangerschaftswoche erreichen die Gefäße die Ora serrata nasal, temporal erst um den errechneten Geburtstermin. Die komplette Reifung der Retina und ihres vaskulären Netzwerkes wird erst nach der Geburt erreicht (Saint-Geniez and D'Amore, 2004; Stahl et al., 2012; Ye et al., 2010).

In Mäusen vollzieht sich die retinale Gefäßentwicklung und Hyaloidalgefäßregression postnatal, die Abläufe sind jedoch ähnlich zum Menschen in drei Phasen, wodurch die Gefäßschichten, superfiziell, intermediär und tief, gebildet werden (siehe Abb. 4 B). Erst nachdem die primäre Gefäßschicht die Peripherie erreicht, was etwa am postnatal Tag (P) 7 geschieht (siehe Abb. 4 A) beginnt die Einsprossung in die Retina. Die Tatsache, dass die retinale Vaskularisierung in Mäusen *ex utero* abläuft und die zweidimensionale Struktur des primären Plexus ermöglichen eine direkte Beobachtung und einfache experimentelle Beeinflussung der retinalen Gefäße (Abb. 4) (Stahl et al., 2010; Uemura et al., 2006).

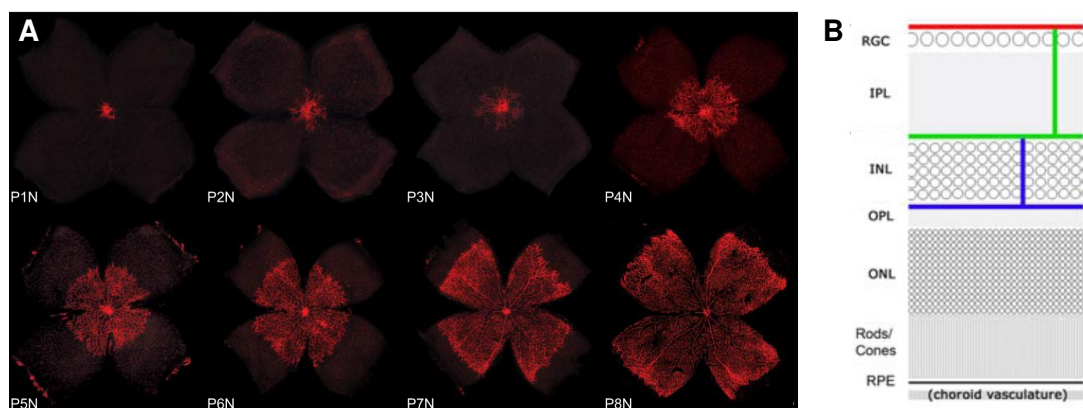


Abb. 4 Postnatale Entwicklung des Blutgefäßsystems und schematische Darstellung in der Mausretina. **(A)** Zentrifugale superfizielle Sprossung. Endothelzellfärbung mit Isolectin B₄-Alexa 594 (Stahl et al., 2010). P = postnatal Tag; N = Normoxie. **(B)** Schematische Retina Darstellung. Rot = superfizielle/ primäre Schicht; Grün = intermediäre Schicht; Blau = tiefe Kapillarschicht. RGC = retinale Ganglienzellen; IPL = innere plexiforme Schicht; INL: innere nukleäre Schicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere nukleäre Schicht; RPE = retinales Pigmentepithel. (Fruttiger, 2007).

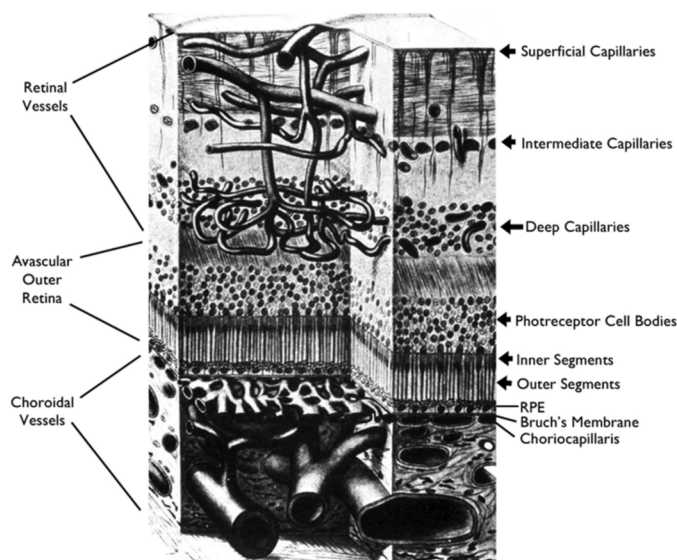


Abb. 5 Aufbau der adulten Retina mit vaskulärer Versorgung. (Campochiaro, 2015).

Die Versorgung der adulten Retina (Abb. 5) wird schlussendlich durch die drei retinalen Gefäßschichten und die choroidalen Gefäße gewährleistet und basiert auf Angebot und Nachfrage. Die innere Retina wird durch den primären/superfiziellen, den intermediären und den tiefen Plexus versorgt (siehe auch Abb. 4 B). Die äußere avaskuläre Retina, die einen hohen Sauerstoffverbrauch durch die Photorezeptoren aufweist, wird durch die Choroidkapillaren versorgt. Dabei verhindern das RPE und die Bruch'sche Membran ein Eindringen von Flüssigkeiten, sind gleichzeitig jedoch durchlässig für Sauerstoff und Nährstoffe und haben damit regulative Funktionen (Joussen, 2007).

1.2.2 Pathologische Angiogenese

Angiogenese ist in NV die vorherrschende Methode der Gefäßneubildung. Quantitative, fehlgesteuerte Gefäßbildung und funktionell inadäquate Blutgefäße sind die Hauptmerkmale. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das umliegende Gewebe und seine Charakteristika. Hypoxie, *low-grade* Entzündungen, Veränderung in Membranstrukturen, und das daraus entstehende Ungleichgewicht von inhibitorischen und stimulierenden Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Stressfaktoren etc., beeinflussen das Ausmaß der NV (Saint-Geniez and D'Amore, 2004). Eine der häufigsten Formen ist die durch Tumore induzierte Gefäßbildung, die strukturell chaotisch ist (Carmeliet and Jain, 2000).

Im Auge sind Erkrankungen, die mit Veränderungen in der retinalen vaskulären Struktur einhergehen, z.B. die zuvor behandelte ROP oder die diabetische Retinopathie. Bei diesen kommt es zu Veränderungen in der Gefäßpermeabilität, Obliteration von Kapillaren, Mikroaneurismen und Perfusionsstörung, die schlussendlich zur proliferativen Phase und NV führen (Frank, 2004). Zur Untersuchung von retinaler und choroidaler NV stehen verschiedene Modelle in der Maus zur Verfügung, wie das Sauerstoff-induzierte Retinopathie Modell, welches die Symptomatik der ROP in der Maus nachahmt.

1.2.3 Sauerstoff-induziertes Retinopathie Modell

Das Sauerstoff-induzierte Retinopathie (OIR, *oxygen induced retinopathy*) Modell ist eines der am weitesten verbreiteten Modelle für pathologische Angiogenese und spielte eine wichtige Rolle in der Entschlüsselung der Pathomechanismen der ROP.

Die Tatsache, dass die physiologische Vaskularisierung der Retina in der Maus postnatal, also *ex utero*, abläuft, hat zwar den Vorteil direkter Beobachtungsmöglichkeit und dem Potential experimenteller Manipulation, jedoch bedeutet dies auch, dass die Exposition gegenüber Raumluft in neugeborenen Mäusen keine pathologische Situation ist, sondern die Norm darstellt. Die Hyperoxie die in Frühgeborenen zur Ausbildung der ROP führt, muss in Mäusen durch Inkubation bei deutlich höheren Sauerstoffpartialdrücken künstlich herbeigeführt werden. Hierzu werden die Mäuse von P7 bis P12 bei 75% O₂ inkubiert (siehe auch Abb. 15 und Kap. 2.2.2), als Folge entstehen Hyperoxie-induzierte avaskuläre Netzhautareale im zentralen Bereich der Mausretina, im Gegensatz zum Menschen, wo diese avaskulären Zonen peripher liegen (Lange et al., 2009).

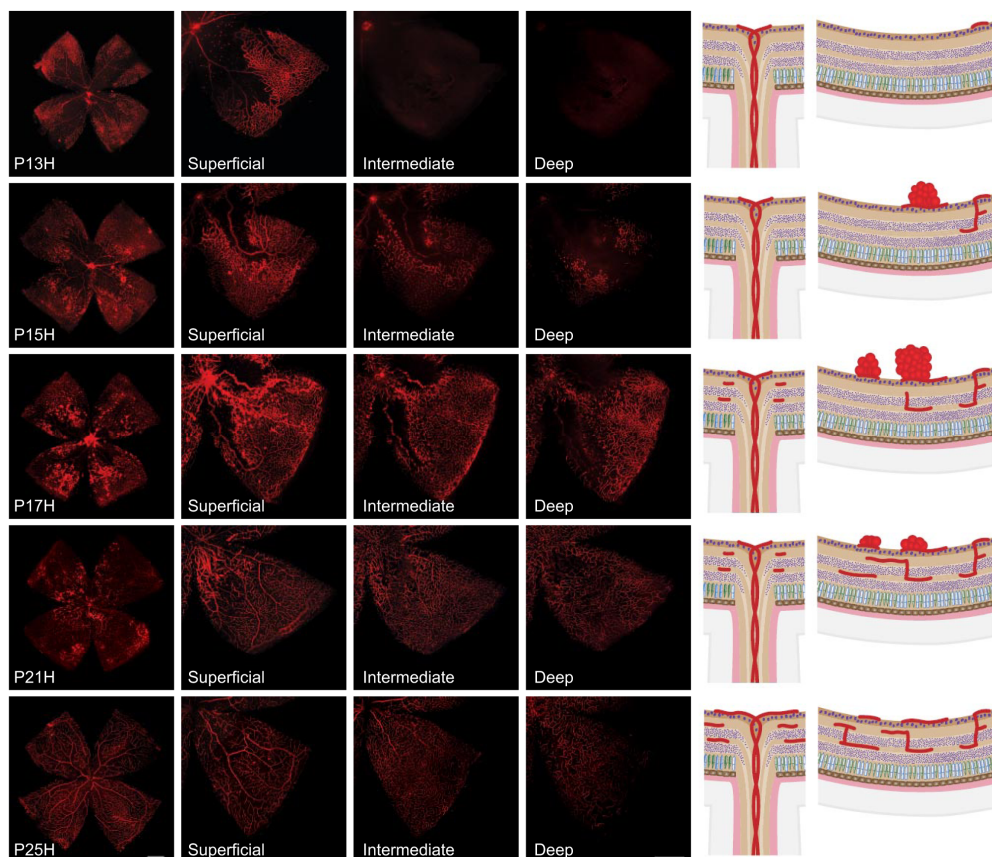


Abb. 6 Gefäßverlust und Neovaskularisation im OIR Modell. Retinale Flachpräparate im OIR Modell von P8 bis P25 wurden mittels Isolectin B₄-Alexa 594 (rot) auf ihre Endothelzellen gefärbt. Die Revaskularisierung der avaskulären Zone im superfiziellen Plexus nach Rückkehr zur Raumluft ist von P13 bis P25 zu erkennen, sowie das Auftreten von NV an P15 mit dem Maximum an P17 und die Regression ab P21. An P25 ist die avaskuläre Zone vollständig revaskularisiert und NV komplett aufgelöst. Das Schema illustriert das Gefäßwachstums, präretinale Neovaskularisation (NV) und die Entwicklung des tiefen und intermediären Plexus. P = postnatal Tag; H = Hypoxie. (Stahl et al., 2010).

An P8, 24 Stunden nach Beginn der Hyperoxiebehandlung, bildet sich ein zentraler Bereich der Vaso-Obliteration (VO-Zone oder auch avaskuläre Zone) im superfiziellen Plexus, während die Bildung des intermediären und tiefen Gefäßsystems durch die Hyperoxie verhindert wird (Abb. 6). Nach der Rückführung zur Raumluft an P12 ist im superfiziellen Plexus ein zentraler Bereich der VO ohne morphologische Anzeichen für NV zu erkennen. Zwischen P12 und P14 entwickeln sich analog zum Menschen an den Randbereichen der avaskulären Zone präretinale Gefäßproliferationen, die in den Glaskörper einspießen können, und Gefäßbüschel (sogenannte *cluster* und *tufts*) bilden (Abb. 6 P15).

Diese zweite Phase des OIR Modells, stellt eine relative Hypoxie dar, welche durch pathologisches Gefäßwachstums gekennzeichnet ist, dieses wiederum wird durch Hochregulierung Hypoxie-induzierter angiogener Faktoren, wie VEGF, ausgelöst. Die NV ist ab etwa P14 nachweisbar und bis P17 ist eine deutliche Verkleinerung der avaskulären Zone durch NV und Revaskularisierung zu erkennen. Ab P15 sind außerdem erste vertikaler Gefäße, die ausgehend von der Peripherie sprießen, erkennbar. Das NV Maximum wird an P17 erreicht, ebenso wie die *cluster* und *tufts* Bildung, wodurch die avaskuläre Zone deutlich geschrumpft ist. Die Ausbildung der intermediären und tiefen Plexi ist ebenfalls vorangeschritten. Die noch vorhandene avaskuläre Zone ist jedoch noch vollständig frei von allen drei vaskulären Schichten (Abb. 6 P17).

In der Maus besteht im Unterschied zum Menschen, die Besonderheit, dass diese präretinalen Proliferationsareale, einhergehend mit einer schnellen Revaskularisierung der avaskulären Areale, zurückgebildet werden, dies ist an P25 gut zu erkennen. Die avaskuläre Zone ist vollständig in allen drei Gefäßschichten revaskularisiert und die NV ist komplett abgeklungen (Abb. 6 P25) (Connor et al., 2009; Stahl et al., 2010).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen der ROP beim Menschen und dem OIR Modell der Maus ist, dass bei menschlichen Frühgeborenen die avaskulären Areale durch Verzögerung im Wachstum der sich entwickelnden Gefäße nach Geburt bedingt sind, in der Maus jedoch durch Obliteration bereits vorhandener Gefäße entstehen.

1.3 Angiogene Wachstumsfaktoren

1.3.1 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Im Gefäßwachstum spielen verschiedene Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren abhängig von ihrer zeitlichen und räumlichen Produktion bzw. Aktivierung spezifische Rollen. VEGF ist der wohl wichtigste angiogene Wachstumsfaktor (siehe Abb. 2) und ist damit auch bei verschiedenen proliferativen Augenerkrankungen von Interesse. Bereits in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts konnte im OIR Modell gezeigt werden, dass in

der hypoxischen Phase VEGF hochreguliert wird und eine VEGF Inhibition eine Abmilderung der Retinopathie zur Folge hat (Aiello et al., 1995; Pierce et al., 1995).

VEGF-A, das prototypische Mitglied der Familie von sezernierten homodimerischen Glykoproteinen, ist ein endothelspezifisches Mitogen und induziert neben Angiogenese auch vaskuläre Permeabilität, und dies weit effektiver als das vasoaktive Histamin. Durch unterschiedliche mRNA Spaltung entstehen aus dem 32-44 kD Protein 5 Isoformen. Davon werden VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ sezerniert, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind dagegen zellständig. Studien zu den verschiedenen Isoformen zeigten, dass diese sich in der Stärke ihres mitogenen Effekt aber auch ihrer Funktionalität unterscheiden. Es existieren drei bekannte Rezeptoren über die VEGF seine angiogenen Effekte vermittelt: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 (Saint-Geniez and D'Amore, 2004).

VEGF wird im Auge von zwei Arten von okulären Mikroglia exprimiert, den Astrozyten in der Ganglienzellschicht und den Müllergliazellen in der inneren nukleären Schicht, welche hierüber eine wichtige Rolle für die Bildung des jeweiligen Blutgefäßsystems spielen. Eine Quelle von exogenem VEGF in der Retina sind Perizyten, welche VEGF synthetisieren und sezernieren. Astrozyten wandern während der Retinogenese ein und bilden ein Netzwerk auf der inneren retinalen Oberfläche, welches als Schablone für das anschließend wachsende Blutgefäßsystem dient, dabei exprimieren sie große Mengen an VEGF (Stone et al., 1995). Die steigende metabolische Nachfrage, vor allem durch Aktivierung der Photorezeptoren, verursacht eine Freisetzung von VEGF aus den Müllerzellen und führt zur radialen Einsprossung der ECs in die inneren retinalen Schichten und die Bildung der beiden inneren vaskulären Plexi.

Während der retinalen Angiogenese wird die VEGF-Expression durch physiologische Hypoxie gesteuert, wodurch ein VEGF-Gradient in der Netzhaut vorliegt. Der Expression liegt die Bindung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors-1 (HIF-1) an das Hypoxiereaktive Element (HRE) zugrunde. Hypoxie inhibiert den unter Normoxiebedingungen stattfindenden Abbau der Untereinheit HIF-1 α , was zu dessen Ansammlung und Translokation führt und schlussendlich durch Bindung der HIF Einheit im Nukleus und der Expression verschiedener Zielgene, unter anderem VEGF. Ein Anstieg der HIF-1 α -Expression korreliert mit der VEGF-Expression während physiologischer und pathologischer retinaler Vaskularisierung in der Maus (Ozaki et al., 1997).

Ein exzessives Gefäßwachstum wird durch die Herunterregulierung der VEGF-Expression mittels physiologischer Hyperoxiezonen verhindert. Die Abwesenheit von VEGF verursacht Apoptose von ECs und damit Obliteration von undifferenzierten Gefäßen. Diese Remodellierung des Gefäßnetzes durch physiologische Regression ausgewählter Gefäßäste ist notwendig, um die wachsenden metabolischen Bedürfnisse der Retina zu erfüllen (Korn and Augustin, 2015).

Diese charakteristische Plastizität ist jedoch ebenso verantwortlich für die hypoxieabhängige pathologische NV. Die unter 1.1.1 beschriebene Verringerung der physiologischen Gewebhypoxie in Phase I der ROP führt zu einer Suppression der Hypoxie-induzierten VEGF-Expression, was den Stillstand des Gefäßwachstums und die Regression naszierender Gefäße nach sich zieht. Diese Vaso-Obliteration bedingt die avaskulären Areale. Im OIR Modell wird dies durch die Haltung in einer hyperoxischen Umgebung erreicht. Die in Phase II auftretende Hypoxie, oder im Fall des Modells nach Rückführung zu Raumluft, verursacht eine exzessive VEGF-Produktion und induziert damit die NV. Eine VEGF-Inhibition in Bezug auf die vaskulären Veränderungen der ROP erscheint aus pathomechanistischer Perspektive sinnvoll. Die Rolle von VEGF als neurotropher Faktor in der Netzhaut und auch als systemisch bedeutsamer Faktor darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden.

1.3.2 Angiopoietine (Angpt)

Neben VEGF spielt auch der Angpt/Tie2 Signalweg eine Rolle in Angiogenese und ist an der Regulierung der adulten vaskulären Homöostase beteiligt. Tie2 ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der überwiegend von vaskulären ECs exprimiert wird und mit den 4 bekannten Wachstumsfaktoren aus der Angiopoietinfamilie (Angpt) bindet (Davis et al., 1996; Lee et al., 2004; Sato et al., 1995). Das Gleichgewicht zwischen den beiden Liganden Angpt 1 und 2 bestimmt den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors und reguliert dadurch endotheliale Barrierefunktionen, das Auswachsen von Gefäßverzweigungen, Reifung, Regression und weitere Aspekte der Angiogenese (Akwii et al., 2019; Hammes et al., 2011; Hansen et al., 2010; Thurston, 2002). Beide Liganden haben eine ähnliche Struktur, beide sind Glykoproteine von etwa 70 kDa und haben einen Amino-Terminus bestehend aus *coiled:coil* Domänen die wichtig für die Ligandenoligomerisierung sind (Davis et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997).

Der physiologische Hauptligand von Tie2 ist Angpt1, ein potenter angiogener Faktor, der den Rezeptor aktiviert und damit die Phosphorylierung stimuliert, was wiederum zur Phosphorylierung von eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase), Akt (Proteinkinase B) und ERK (extrazelluläre signalregulierte Kinase) führt (Davis et al., 1996; Kim et al., 2000a). Angpt2 ist ein mit Angpt1 konkurrierender Agonist, mit dem er etwa 60% seiner Aminosäuresequenz teilt, und agiert als natürlicher Angpt1/Tie2 Inhibitor, was zur Verringerung der Rezeptorphosphorylierung führt und Angpt2 zu einem Tie2 Antagonisten macht (Kim et al., 2000b). Im Unterschied zu Angpt1 zeigt Angpt2 ein autokrines Verhalten und seine Expression ist stark reguliert (Maisonpierre et al., 1997), z.B. durch

Entzündungsmediatoren (Huang et al., 2002), Hypoxie (Kelly et al., 2003; Wang and Lash, 2017) und verschiedene Krebsarten wie z.B. Gliome (Hu and Cheng, 2009).

Während der Entwicklung scheint die Angpt1-Expression in Perizyten der initiale Schritt der Gefäßreifung zu sein, was zu Differenzierung von ECs, Rekrutierung von Perizytenvorläufern, Gefäßstabilisierung und -reifung führt und die Blut-Retina-Schranke fördert (Fiedler et al., 2006; Yao et al., 2007). Angpt1 defiziente Mäuse sind embryonisch letal und zeigen signifikante Defekte in den Blutgefäßen (Suri et al., 1996).

Angpt2 induziert Gefäßdestabilisierung, die essentiell für weitere Gefäßsprossung ist, und spielt eine Rolle bei der postnatalen vaskulären Remodelling und Gefäßregression (Hackett et al., 2002; Maisonpierre et al., 1997). In ischämischer Retina und während der retinalen Gefäßentwicklung wurde erhöhte Angpt2-Expression festgestellt (Hackett et al., 2000). Damit ist für die Modulation von Blutgefäßen das Zusammenspiel zwischen VEGF und dem Verhältnis von Angpt1 und Angpt2 bestimmend. Wenn Angpt2 in höherem Anteil als Angpt1 vorliegt und die VEGF-Expression in hypoxischen Gewebe ebenfalls hoch ist, hat dies Gefäßwachstum zur Folge. In der Abwesenheit von VEGF führt die Hochregulierung von Angpt2 zur Vasoregression. Apoptose von ECs, Kapillarverschlüsse und Obliteration undifferenzierter Gefäße sind die Folge, was Teil der notwendigen Gefäßbeschneidung und Remodellierung des Gefäßnetzes ist. Isolierte Herunterregulierung oder die Abwesenheit von Angpt1 führt zur Gefäßdestabilisierung (Fagiani and Christofori, 2013; Yamada et al., 1999; Yao et al., 2007).

Dieses Zusammenspiel zwischen Angpt2 und VEGF spielt auch eine wesentliche Rolle in der NV. Weder Angpt1 noch Angpt2 induzieren NV alleine. Eine Zunahme nicht ausreichend durchbluteter Bereiche führt zur Hochregulierung der Hypoxie-induzierten Faktoren VEGF und Angpt2. Angpt2 fördert so die Gefäßdestabilisierung und Sprossung, die Voraussetzung sind um NV zu initiieren, im Zusammenspiel mit VEGF wird so eine Steigerung der NV erreicht (Asahara et al., 1998; Oshima et al., 2005). Angpt1 dagegen unterdrückt retinale oder choroidale NV, aber stimuliert niemals Gefäßregression oder NV (Nambu et al., 2004)

1.4 Sphingolipide

Lipide sind vor allem durch ihre Funktion als strukturelle Membrankomponenten und Energieträger bekannt. Sie spielen jedoch ebenso eine wichtige Rolle als Signalmoleküle um verschiedene zelluläre Aspekte zu regulieren. Sphingolipide, die 1884 das erste Mal von J. L. W. Thudichum in neuralen Geweben beschrieben und als essenzielle Komponenten aller eukaryotischer Zellmembranen etabliert wurden, sind eine Lipidfamilie, die sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Botenstofffunktionen haben. Über die Zeit

wurden mehr und mehr Mitglieder der Familie entdeckt und die Regulierung multipler Zellfunktionen durch verschiedenste Sphingolipide konnte erfolgreich bewiesen werden (Hannun and Obeid, 2018). Sphingosin (Sph) wurde dabei als erstes bioaktives Lipid etabliert, aufgrund seiner Beteiligung an der Regulierung der Proteinkinase (PK) C-Aktivität (Hannun et al., 1986; Rotstein et al., 2010).

1.4.1 Struktur

Sphingolipide sind amphipathische Moleküle, ihre hydrophobe Region beinhaltet eine langkettige Sphingoid-Base, an die eine Fettsäure gebunden ist. Mehr als 60 verschiedene Sphingolipidbasen sind bereits identifiziert (Pruett et al., 2008), in Säugetieren ist Sph, ein langkettiger Aminoalkohol mit 18 bis 20 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung zwischen C-4 und C-5, die häufigste Base (Abb. 7, rot umrandet). Durch eine Amidbindung wird eine Fettsäure an Sph gebunden, was in einem stark hydrophobischen Molekül resultiert: Ceramid (Cer), das Rückgrat vieler komplexer Sphingolipide (Kolesnick et al., 2000; Merrill, 2002).

Diese gebundenen Fettsäuren können in ihrer Länge variieren (C2 bis C28) und sind normalerweise gesättigt. Sehr lange mehrfach ungesättigte Ketten kommen in spezialisierten Zellen vor, z.B. den Spermatozyten (C24 bis C34 Kettenlänge) (Furland et al., 2007). An Cer wiederum können verschiedenste Kopfgruppen am C-1 angefügt werden, was zu komplexen Sphingolipiden führt. So wird durch die Bindung von Phosphorylcholin Sphingomyelin (SM) gebildet, während die Bindung eines Zuckers, zum Beispiel Glukose oder Galaktose, zur Bildung komplexer Glykosphingolipide führt (Sprong et al., 2003). Diese Diversitätsmöglichkeit im Aufbau von Sphingolipiden zusammen mit dem komplexen Metabolismus und ihrer Fähigkeit verschiedene Zellstimuli zu interkonvertieren, ist Grundlage der außergewöhnlichen Flexibilität in der Modulation eines weiten Spektrums an Zellantworten (Simon et al., 2019).

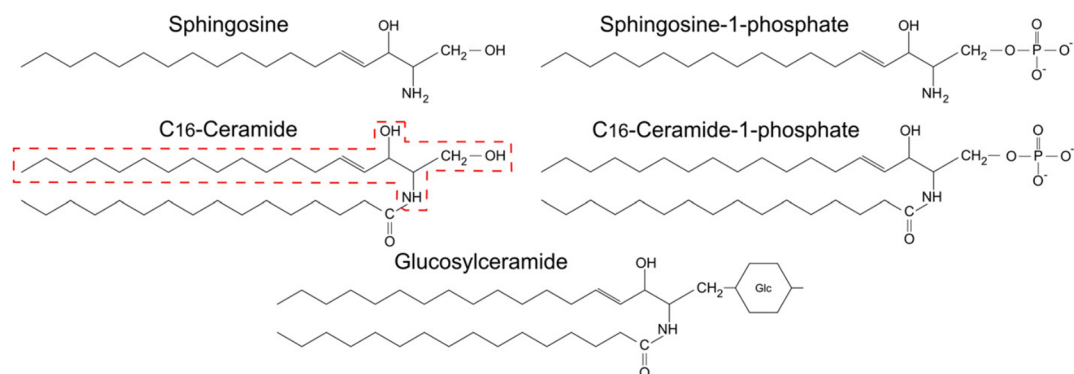


Abb. 7 Chemische Struktur von Sphingolipiden. In rot ist der langkettige Aminoalkohol Sphingosin hervorgehoben der in allen Sphingolipiden als Basis enthalten ist. (Rotstein et al., 2010).

1.4.2 Metabolismus

Die zentrale Rolle im Sphingolipidmetabolismus nimmt Cer ein, welches durch verschiedene enzymatische Wege generiert wird: der SM-Zyklus, der in verschiedenen Zellkompartimenten stattfindet, die *de novo* Synthese, die im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet (Mandon et al., 1992), und der *salvage* Weg, wo Cer durch Recycling von Sph und komplexen Sphingolipiden gebildet wird (Abb. 8).

Im SM-Zyklus hydrolysieren Sphingomyelinasen (SMase) membranintegriertes SM zu Cer und Phosphocholin. Die sauren und neutralen Isoformen der SMase werden als Antwort auf viele extrazelluläre Stimuli in Lysosomen, Endosomen und an der Plasmamembran aktiviert (Bartke and Hannun, 2009). In der *de novo* Synthese wird zuerst 3-Keto-Dihydrosphingosin durch Kondensierung von Palmitat und Serin synthetisiert, welches weiter zu Dihydrosphingosin (Sphinganine (dhSph)) reduziert wird, gefolgt von der Acylierung durch (Dihydro-) Ceramidsynthase (Lass / CerS). Schlussendlich wird Cer durch eine Desaturase gebildet (Simon et al., 2019).

Weiterhin kann Cer durch die Ceramidkinase zu Ceramid-1-Phosphat phosphoryliert werden (Wijesinghe et al., 2005). Im Golgi-Apparat wird Cer durch die SM-Synthase durch Anfügen von Phosphorylcholin zu SM konvertiert. Schlüsselschritte in der Bildung komplexer Glykosphingolipide ist die Bindung von Glukose oder Galaktose an Cer durch die Glykosyltransferase dadurch werden im ER Galaktosylceramide und im Golgi-Apparat Glykosylceramide generiert (Sprong et al., 2003).

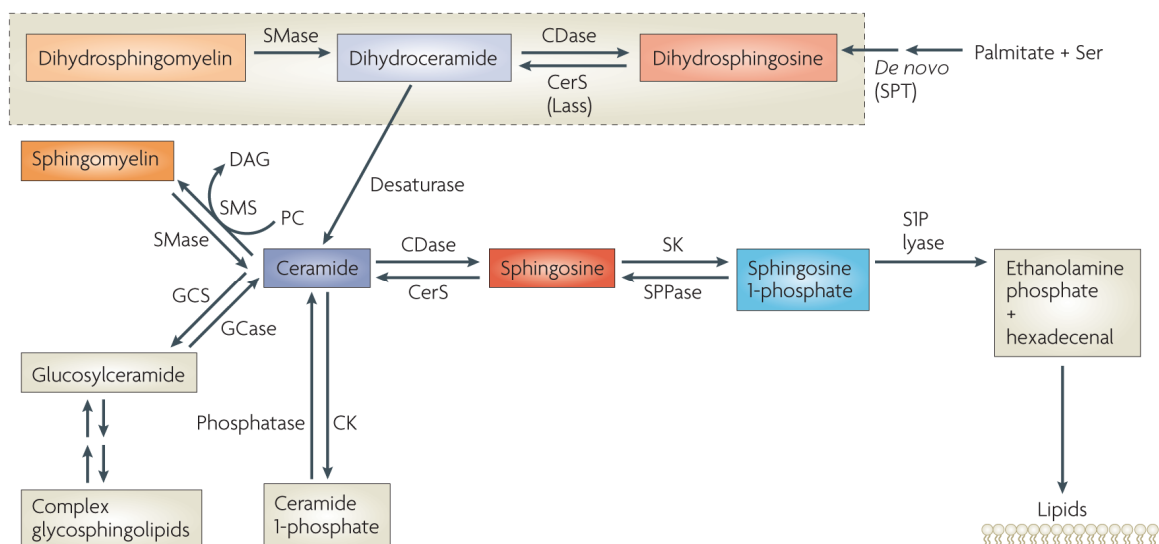


Abb. 8 Der Sphingolipidmetabolismus. Cer wird als der Knotenpunkt im Sphingolipidmetabolismus angesehen und kann reversibel in andere miteinander verbundene bioaktive Lipidarten, wie Sphingosin und S1P, konvertiert werden. Der einzige irreversible Stoffwechselweg des Sphingolipidmetabolismus wird durch die S1P-Lyase vermittelt. (Hannun and Obeid, 2008).

Die Basis vieler Sphingolipide ist Sph, welches durch die Ceramidsynthase (CerS) zu Cer umgewandelt wird, und nachfolgend durch die Sphingosinkinasen (Sphk) zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Diese Schritte sind reversibel, indem S1P durch die S1P-Phosphatasen zu Sph dephosphoryliert wird, ebenso kann Cer durch die Ceramidasen (CDase) durch Abspaltung einer Fettsäure zu Sphingosin umgewandelt werden (Hannun and Obeid, 2008). Der Endpunkt des Sphingolipidmetabolismus, der nicht reversibel ist, ist der Abbau von S1P durch die S1P-Lyase zu Phosphoethanolamin (Ethanolaminphosphat) und Hexadecenol (Abb. 8) (Bandhuvula and Saba, 2007).

1.4.3 Das Sphingolipidgleichgewicht

Ein besonderes Merkmal des Sphingolipidstoffwechsels, das die Komplexität von Sphingolipiden und ihrer Signalwege ausmacht, ist der Antagonismus zwischen den zellulären Reaktionen die auf der einen Seite von Sph und seinem direktem Vorläufer Cer und auf der anderen Seite von S1P reguliert werden. Verschiedene Stressfaktoren aktivieren Enzyme der Cer- und Sph- Biosynthesewege, wodurch deren Level ansteigen und zu proapoptotischen und wachstumsinhibierenden Effekten führen. Auf der anderen Seite steigern Wachstumsfaktoren die Aktivität der Sphk, wodurch die intrazelluläre S1P Konzentration ansteigt und Proliferation und Zellüberleben gefördert werden.

Die biologische Relevanz der Sphingolipide als Sekundärbotenstoffe wird durch ihr konserviertes Vorkommen im Genom vom Menschen bis zur Hefe hervorgehoben. Da Cer, Sph und S1P, abhängig von der jeweiligen Zellzustand, ohne weiteres ineinander umwandelbar sind, ist es wesentlich für die Zellfunktion, eine Feinabstimmung in ihrem Vorkommen und damit ein dynamisches Equilibrium aufrechtzuerhalten (Spiegel and Milstien, 2003). Dieses Gleichgewicht wird als „Sphingolipid-Rheostat“ bezeichnet (Abb. 9), welches ausschlaggebend für das Zellschicksal ist und über die Umwandlung von Cer und S1P über Sph aufrechterhalten wird (Cuvillier et al., 1996).

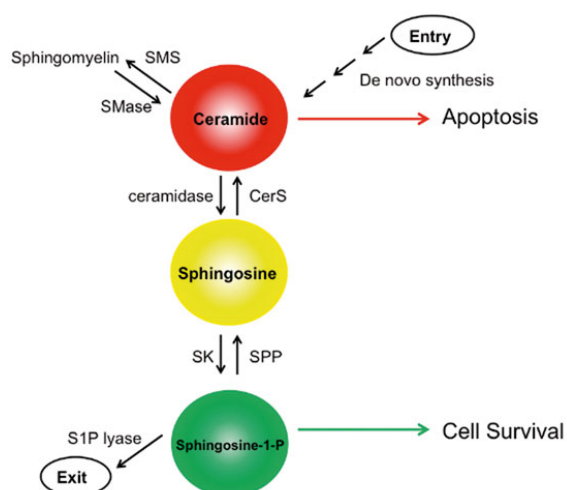


Abb. 9 Das Sphingolipid-Rheostat. Das Equilibrium wird durch gegenseitige Umwandlung von Cer und S1P über Sph aufrechterhalten. (Tirodkar and Voelkel-Johnson, 2012).

1.4.4 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

S1P, das Produkt aus der Sph Phosphorylierung, ist ein bioaktives Lysophospholipid, welches multiple Prozesse reguliert, die wesentlich für die zelluläre Homöostase sind. Dazu gehören Wachstum, Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Migration und Immunfunktionen (Alvarez et al., 2007; Saba and Hla, 2004; Spiegel and Milstien, 2002). Diese funktionale Diversität hebt die zentrale Rolle von S1P in Erkrankungen wie Krebs, Atherosklerose, Autoimmunerkrankungen aber auch in Entzündungsvorgängen und der Angiogenese hervor (Kim et al., 2009; Takabe and Spiegel, 2014).

Sph, der Ausgangsstoff für S1P entsteht aus Cer durch Abspaltung einer Fettsäure, welches wiederum aus in der Plasmamembran vorhandenen Sphingolipiden, wie SM und Glykosphingolipiden, direkt an der Membran oder in den Lysosomen gebildet wird (Hla, 2005; Proia and Hla, 2015; Spiegel and Milstien, 2003). Die Synthese von S1P aus Sph wird von Sphks katalysiert (Hait et al., 2006), von denen in Säugetieren zwei Isoformen existieren, Sphk1 und Sphk2, auf die unter 1.4.5 näher eingegangen wird.

Gebildetes S1P kann dann drei unterschiedliche Wege gehen. Erstens kann es durch S1P Transporter aus der Zelle gebracht werden und an der Zellmembran mit seinen fünf G Protein-gekoppelten Membranrezeptoren (GPCRs) im Sinne einer *inside out* Signalisierung interagieren, oder über noch weitgehend unbekannte Zielmoleküle intrazelluläre Effekte (Zhang et al., 1991) ausüben. Zweitens kann S1P durch die S1P Lyase irreversibel abgebaut werden, wodurch Hexadecenal und Phosphoethanolamin entstehen, welche in den Glycerolipid-Biosyntheseweg eingespeist werden. Drittens wird S1P durch die S1P Phosphatase dephosphoryliert und zu Sph recycelt (siehe Abb. 8).

Seine proliferativen Eigenschaften vermittelt S1P vor allem über intrazelluläre Signaltransduktion. Zytokine und Zellüberleben begünstigende Faktoren senden Signale zur Sphk Aktivitätssteigerung über ihre jeweiligen Rezeptoren (Abb. 10), dies kann entweder auf einer gesteigerten Transkription der Kinasen basieren oder auf der raschen Aktivierung und Translokation zur Plasmamembran. Die daraus resultierende S1P Akkumulation aktiviert Signalwege, die die Calciummobilisierung, DNA Synthese, Zellwachstum, Tumorgenese, Proliferation und Apoptose Suppression regulieren (Rotstein et al., 2010; Spiegel and Milstien, 2003; Young and Nahorski, 2002).

Frisch gebildetes S1P kann außerdem durch Spinster 2 (Spns2) und ABC Transporter in das extrazelluläre Milieu sekretiert werden, wo es über Aktivierung von S1P-Rezeptoren auf autokrine und parakrine Art und Weise agiert (Lebman and Spiegel, 2008). Diese *inside-out* S1P Signaltransduktion aktiviert nachgeschaltete Signalwege, die vielfältige biologische Prozesse regulieren (Abb. 10) (Mohammed and Harikumar, 2017).

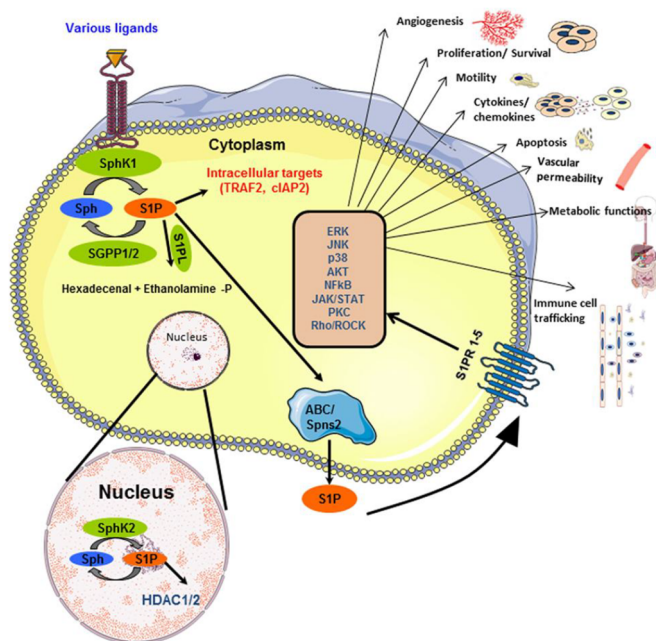


Abb. 10 S1P Signaltransduktion. S1P kann sowohl intrazellulär wie auch extrazelluläre Signalwege aktivieren, die an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt sind. (Mohammed and Harikumar, 2017).

Weiterhin unterdrückt S1P Apoptose, welche durch multiple Insulte in vielen Zellen induziert wird (Cuvillier et al., 1996; Van Brocklyn et al., 2005), erhöht die Ca^{2+} Mobilisierung (Itagaki and Hauser, 2003; Meyer zu Heringdorf et al., 2003) und stimuliert den ERK/MAPK Signalweg um Zellwachstum und Zellüberleben zu fördern (Cuvillier et al., 1996).

Außerdem aktiviert S1P den PI3K/Akt Signalweg (Brizuela et al., 2007) wodurch die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen (*B-cell lymphoma 2*) (Betito and Cuvillier, 2006), und Zellüberleben fördernden Aktivator-Protein-1 und NF- κ B (Nuklearfaktor *kappa-light-chain-enhancer* aktivierter B-Zellen) beeinflusst wird (Saini et al., 2005). Nukleäres S1P wirkt als Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC) um Gentranskription epigenetisch zu regulieren (Hait et al., 2009).

S1P liegt im Blutplasma normalerweise in mikromolaren Konzentrationen vor, während es im Gewebe im nanomolaren Bereich vorhanden ist (Hla et al., 2008). Etwa 35% des plasmatischen S1P sind an Albumin und etwa 65% an ApoM gebunden, was auf einem kleinen Anteil von HDL (Lipoprotein hoher Dichte) Partikeln zu finden ist und zu der vaso-protectiven Eigenschaft von HDL beiträgt (Blaho and Hla, 2014). Ferner ermöglichen hohe S1P-Level im Plasma (0,1 – 1 μM) und erhöhte kritische Konzentrationen in Mizellen (etwa 12 – 14 μM bei physiologischem pH) es S1P als effektiver primärer Botenstoff zu agieren, da die Konzentration seiner Monomere in der Blutbahn deutlich über dem K_D für S1P-Rezeptoren liegt (Garcia-Pacios et al., 2009; Kim et al., 2009; Sasaki et al., 2009).

Im zentralen Nervensystem hat S1P vielfältige Funktionen. So ist in spezifischen Hirnregionen während der Neurogenese der S1P1-Rezeptor stark exprimiert (McGiffert et al., 2002) und ein S1PR1 *knockout* oder ein Sphk1/Sphk2 Doppel*knockout* in Embryos führt zu erheblichen Defekten (Mizugishi et al., 2005; Okada et al., 2009). Die Proliferation neuraler Vorläuferzellen wird durch Aktivierung der S1PRs durch S1P stimuliert und fördert

die Differenzierung zu Neuronen und Astrozyten (Harada et al., 2004). Forschungsarbeiten weisen ebenso auf eine Relevanz in der Gliazellenproliferation in physiologischen und pathologischen Prozessen hin (Wu et al., 2008). Ferner setzen Astrogliazellen S1P frei, was im ZNS durch autokrine / parakrine Signaltransduktion Zellüberleben und -wachstum in unterschiedlichen Stadien der neuronalen Entwicklung unterstützt (Hait et al., 2006).

Es ist bekannt, dass S1P zur Regulation vaskulärer Prozesse beiträgt und eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt. So induziert VEGF zwar die Bildung von Blutgefäßsprossen, zusätzlich liegt jedoch auch ein S1P Gradient in den entstehenden Blutgefäßen vor. Die Tip-Zellen der sprießenden Gefäße produzieren selbst nur geringen Mengen S1P. Wenn diese Tip-Zellen zur Bildung von Lumen und Blutfluss anastomosieren, aktiviert im Blut enthaltenes S1P den S1PR1, was die Entstehung von Adhäsionsverbindungen fördert, VEGF Signale inhibiert, Gefäßsprossung unterdrückt und neue vaskuläre Verbindungen stabilisiert (Gaengel et al., 2012; Mendelson et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass S1P über den S1PR1 während des physiologischen Gefäßwachstums ein Proliferationsstopp- und Reifungssignal für aussprossende Gefäße ist. Zusätzlich bestehen multiple Interaktion zwischen S1P und den Signalwegen von Wachstumsfaktoren. S1P kann deren Rezeptoren, wie andere GPCRs, transaktivieren. Dieser *cross-talk* wurde unter anderem für VEGF beschrieben.

Die Eigenschaft von S1P zur Stimulierung von ECs basiert zu Teilen auf seiner Fähigkeit den VEGFR-2 in der Abwesenheit von VEGF zu aktivieren (Endo et al., 2002; Tanimoto et al., 2002), dafür ist unter anderem der Signalweg über S1PR3 notwendig (Jin et al., 2018). Im Gegenzug wird Sphk1 aktiviert und damit DNA-Synthese, durch EKR1/2 Aktivierung in ECs, induziert. Weiterhin kann VEGF die Expression von S1PRs erhöhen (Igarashi et al., 2003a) und erhöht damit gleichzeitig die Möglichkeit für S1P den VEGF-Rezeptor zu aktivieren. Dies zeigt dass der Signalweg zwischen S1P und VEGF bidirektional ist (Lebman and Spiegel, 2008).

1.4.5 Sphingosinkinasen

Wie bereits unter 1.4.4 erwähnt, kommen in Säugetieren zwei Isoformen der Sphks vor (Pitson, 2011). Diese werden im Menschen von den Genen SPHK1 und SPHK2 codiert und sind auf den Chromosomen 17 und 19 lokalisiert. Sphk1 und Sphk2 unterscheiden sich zwar in ihrer Länge (384 und 618 Aminosäuren) (Liu et al., 2000a), weisen aber dennoch in den überlappenden Bereichen eine 80%ige Homologie auf und ihre Sequenzidentität stimmt zu 45% überein. Alle eukaryontischen Sphks weisen fünf hoch konservierte Regionen C1-C5 auf, welche für die ATP Bindung und katalytische Eigenschaft verantwortlich sind (Leclercq and Pitson, 2006).

Die längere Sphk2 weist eine zusätzliche zentrale Prolin-reiche Region auf, die sich mit der Sphingosinbindungsregion zu überschneiden scheint, wodurch ein Unterschied der beiden Enzyme in ihrer Substratbindungsfähigkeit vorliegen könnte (Neubauer and Pitson, 2013). Die Aktivität beider Isoformen kann durch Zytokine und Wachstumsfaktoren verstärkt werden. Beide weisen ebenso eine intrinsische katalytische Aktivität auf, unabhängig von eukaryontischer posttranslationaler Modifikation, die in einer zellulären Aktivität auch in Abwesenheit einer agonistischen Stimulation, resultiert (Pitson et al., 2000). Diese basale Sphk Aktivität spielt eine Rolle in der Erhaltung zellulärer Sph und Cer-Level und damit der Aufrechterhaltung des „Rheostats“ (Chan and Pitson, 2013).

Beide Isoformen werden ubiquitär exprimiert, weisen jedoch Unterschiede in der Gewebeexpression, der subzellulären Lokalisierung, der Expression während der Entwicklung und in katalytischer und kinetischer Eigenschaft auf. Auch in ihren biologischen Funktionen unterscheiden sie sich und scheinen zum Teil gegensätzliche Funktionen auszuüben. So wird Sphk1 vor allem in Lunge, Milz, Niere und Ovarien hoch exprimiert, wogegen Sphk2 in den meisten neuronalen Geweben stark exprimiert vorzufinden ist (Blondeau et al., 2007).

Sphk1 ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches nach Agonisten-Stimulation durch ERK 1/2 phosphoryliert wird, dies führt zu einem 14-fachen Anstieg der katalytischen Aktivität und zur Translokation an die Plasmamembran, basierend auf der Interaktion mit Calcium und dem Integrin-bindenden Protein 1 (CIB1). Dort katalysiert Sphk1 die Bildung von S1P aus Plasmamembran-assoziiertem Sph (Pitson, 2011; Wattenberg, 2010). Von Sphk1 katalysiertes S1P wird aus der Zelle transportiert oder agiert intrazellulär. Sphk1 selbst kann ebenfalls aus Zellen entlassen werden, um extrazellulär die Bildung von S1P aus Sph zu katalysieren (Abb. 11).

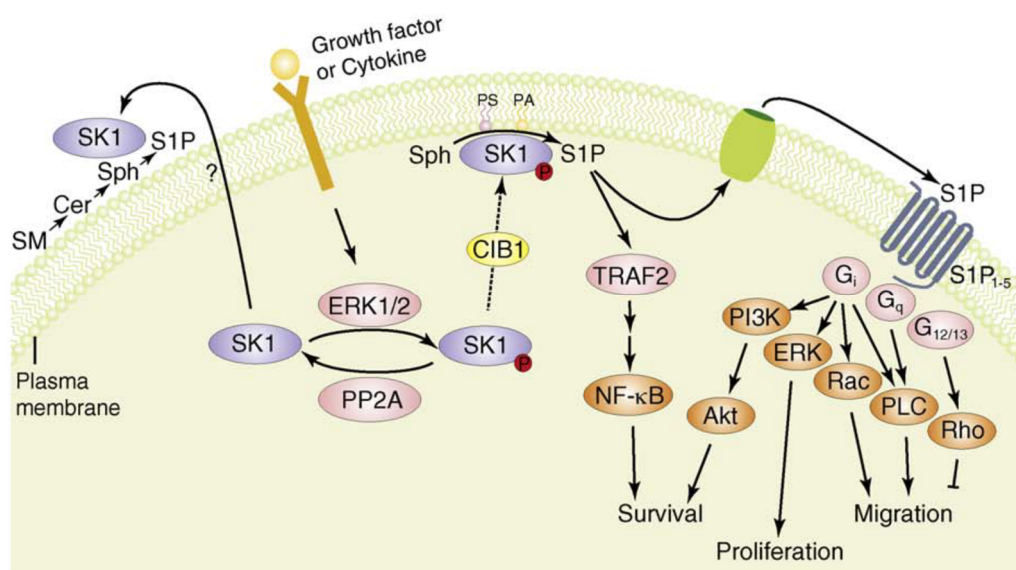


Abb. 11 Regulation und Signalwege der Sphingosinkinase 1. (Pitson, 2011).

Sphk1 wird vor allem mit Proliferation, Zellwachstum und Zellüberleben assoziiert. Während dies bei akuter Gewebeverletzung oder inflammatorischen Prozessen günstig sein kann, spielt es auch eine wichtige Rolle in der Krebspathologie. In vielen onkologischen Studien konnte gezeigt werden, dass Sphk1 in soliden Tumoren hochreguliert wird, diese hohe Expression korreliert mit einer schlechten Patientenprognose (Neubauer and Pitson, 2013).

Sphk2 dagegen ist ein putatives BH3-only Protein, seine Translokation aus dem Zytosol zum ER und dem Nukleus wird durch Stress begünstigt (Igarashi et al., 2003b; Maceyka et al., 2005). Viele frühe Studien zeigten, dass eine Sphk2 Überexpression zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt (Igarashi et al., 2003b; Maceyka et al., 2005; Okada et al., 2005), jedoch scheint seine Funktion vielfältig zu sein (Abb. 12). Sphk2 Aktivierung wird ebenfalls durch ERK1/2 Phosphorylierung als Antwort auf eine Einwirkung von vielerlei Wachstumsfaktoren und Zytokinen vermittelt.

Das Zellkern-Zytoplasma-Shuttling von Sphk2 wird durch nukleäre Lokalisierungssignale und Exportsignale reguliert. Im Nukleus interagiert Sphk2 mit dem Histon H3-HDAC1/2 Komplex. Dort synthetisiertes S1P kann die, durch HDAC1/2 vermittelte, De-Acetylierung des H3 Histons inhibieren und damit die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21 und des Transkriptionsregulator c-fos fördern (Abb. 12). Sphk2 vermittelt Apoptose durch seine putative BH3 Domäne, welche mit Bcl-x_L, einem Mitglied der pro-survival Bcl-2 Familie, interagieren und diesen wahrscheinlich auch binden kann (Liu et al., 2003). Weiterhin wurde bei der murinen Sphk2 eine Interaktion mit dem Interleukin (IL)-12 Rezeptor b1 festgestellt, wodurch nachgeschaltete IL-12 Signale und Produktion von Interferon (IFN)-c vermittelt werden. Als Antwort auf Serummangel oder Zelldichte wird Sphk2 an das ER lokalisiert, dort produziertes S1P wird in den *salvage* Weg eingespeist, welcher ultimativ in der Generierung von pro-apoptotischen Cer via ER-lokalisierter S1P-Phosphatase und CerS resultiert (Neubauer and Pitson, 2013).

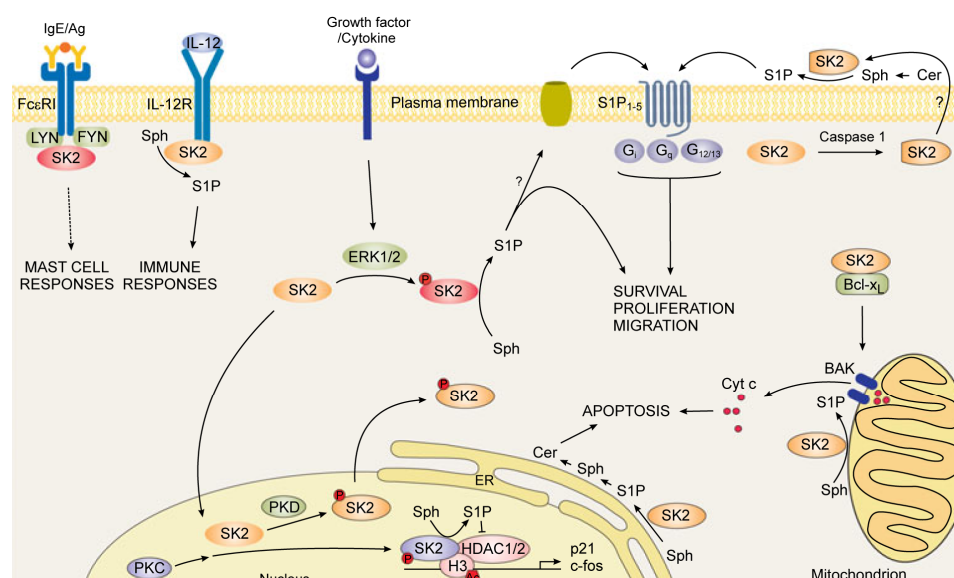


Abb. 12 Regulation und Signalwege der Sphingosinkinase 2. (Neubauer and Pitson, 2013).

Mitochondriale Lokalisierung von Sphk2, und damit subsequente S1P Produktion, vermittelt via BAK-abhängiger Membranpermeabilisierung und Cytochrom C Ausschüttung den mitochondrialen Signalweg der Apoptose (Abb. 12) (Chipuk et al., 2012; Liu et al., 2000a). Auch die aktivierte Sphk2 kann nach Spaltung am N-Terminus durch Caspase-1 aus der Zelle ausgeschleust werden und zu extrazellulärer S1P-Produktion beitragen.

Eine weitere Besonderheit von Sphk2 ist, dass es das Sph Analogon FTY720/Fingolimod (Gilenya®) phosphorylieren kann, der erste orale Wirkstoff der zur Behandlung von Multipler Sklerose (MS) zugelassen ist. Eine bekannte Nebenwirkungen von Fingolimod ist jedoch das Auftreten von retinalen Makulaödemen (Schelenz et al., 2018).

1.4.6 S1P-Rezeptoren

Die biologischen Effekte von S1P werden vor allem seiner hoch-affinen Rezeptorbindung an den 5 bekannten GPCRs zugeschrieben. Diese fünf Rezeptoren (S1PR1 – 5) weisen jeweils spezifische Expressionsmuster und Zellsignalwegsfunktionen auf (Abb. 13) (Blaho and Hla, 2014), was zu einer großen Varietät in der Zellantwort auf die S1P Signaltransduktion führt (Schwalm et al., 2013).

Der am besten untersuchte S1PR1 ist nahezu ubiquitär exprimiert, sehr gut charakterisiert sind seine Funktionen in ECs, B-Zellen und T-Zellen. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der Gefäßsysteme (Allende et al., 2004; Liu et al., 2000b). In Hirn, Retina, Herz, Lunge und Milz konnte eine Gewebsexpression von S1PR1 deutlich nachgewiesen werden, signifikante Expressionen sind aber auch in anderen Geweben zu finden. S1PR1 stimuliert die Gefäßummantelung durch glatte Muskelzellen, schützt die Integrität der Endothel- und Epithelbarriere und reguliert die Lymphozytendistribution.

S1PR2 und S1PR3 sind ebenfalls ubiquitär exprimiert (Kono et al., 2004; McGiffert et al., 2002) und im Zusammenspiel mit S1PR1 ebenfalls wichtig für die korrekte vaskuläre Entwicklung (Mendelson et al., 2014). Dabei spielt S1PR2 vor allem eine Rolle bei endothelialen Schrankenstörungen und vaskulärem Schaden und ist damit ein Gegenspieler von S1PR1 (Obinata and Hla, 2012). Die Signaltransduktion über S1PR2 ist wichtig für die Zellmigration und der Rezeptor agiert auch hier als Gegenspieler von S1PR1 und S1PR3 (Gandy et al., 2013). S1PR2 wird weiterhin für die korrekte Ausbildung des vestibulären Systems und des Gehörs benötigt (Agarwal et al., 2016). Neben seinen Aufgaben bei Migration und Integritätsregulierung der Endothel- und Epithelbarriere und der Aktivierung von VEGFR (Jin et al., 2018), spielt S1PR3 eine Rolle bei Antwort auf bakterielle Infektion (Abou et al., 2017), in Nozizeption und Juckreiz (Donati et al., 2018).

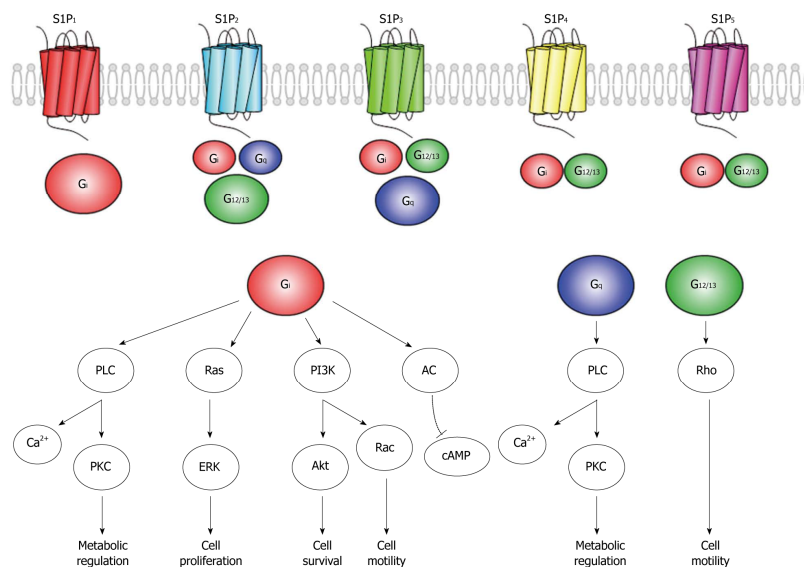


Abb. 13 Schematische Darstellung der Signaltransduktion von S1P über seine Rezeptoren. (Kawabori et al., 2013).

Eine S1PR4- und S1PR5-Expression konnte bisher vor allem in Zellen des Immun- und Nervensystems nachgewiesen werden (Graler et al., 1998; Im et al., 2000). S1PR4 spielt dabei eine wichtige Rolle in der Differenzierung dendritischer Zellen (Blein-Nicolas et al., 2015) und in der Chemoattraktion von Immunzellen (Kehrl et al., 2009). Weiterhin sorgt seine Aktivierung zu einer Neuordnung des Zytoskeletts.

Der vorrangig in den Oligodendrozyten des Gehirns exprimierte S1PR5 ist bei der Zellmigration wichtig und kann, durch selektive Modulation seiner Aktivität, Demyelinisierung reduzieren (O'Sullivan et al., 2016) und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke verändern (Bravo et al., 2018), eine Aktivierung führt zur Inhibition von ERK1/2 und damit zur Proliferationshemmung. Im Gegensatz zu der anscheinenden untergeordneten Rolle der S1P-Rezeptoren 4 und 5, ist die Deletion von S1PR1, 2 und 3 letal (Kono et al., 2004; Liu et al., 2000b; Strub et al., 2010). Bei Endothelzellen ist bekannt, dass sie je nach Aktivierungsstand verschiedene S1PRs aktivieren um damit ihre Barriereigenschaften beeinflussen (Blaho and Hla, 2014).

Das zur Behandlung von MS zugelassene Sph-Analogon FTY720/Fingolimod (Gilenya®), welches wie bereits erwähnt von der Sphk2 phosphoryliert wird, agiert als S1PR1, 3, 4, und 5 Agonist und inhibiert die Auswanderung von Lymphozyten, die physiologischerweise entlang des S1P-Gradienten zwischen Lymphknoten und Blutbahn erfolgt, durch Herunterregulation des S1PR1 von der Zelloberfläche im Sinne eines Agonisten-induzierten funktionellen Antagonismus (Chun and Hartung, 2010; Obinata and Hla, 2012).

1.4.7 Retinale Sphingolipidzusammensetzung

In der Retina von Rindern und Ratten machen Sphingolipide etwa 11-13 (mol) % aus (Brush et al., 2010). SM ist die häufigste Sphingolipidspezies und macht etwa 2,4-2,5% der totalen retinalen Lipide aus, Cer und Glukosyoceramid dagegen weniger als 1%. Retinale Sphingolipide haben zu 90% gesättigte und besonders langkettige gesättigte Fettsäuren, mit 18:0 und 16:0 als die häufigsten. In der Mausretina sind 80% 18:0 und 16:0 Cer, mit 21% die 20:0 oder längere Fettsäuren beinhalten (Fox et al., 2006).

Verschiedene Studien belegen, dass das retinale Sphingolipidprofil durch retinale Pathologien modifiziert wird. In diabetischen Mäusen z.B. wird ist die Masse an Cer verringert im Vergleich zu gesunden Mäusen, ohne Veränderung bei Sph und SM aufzuweisen (Fox et al., 2006). In einem Modell der Retinitis pigmentosa (RP), bei der die Degeneration der Photorezeptoren mit der Lichtreaktivität beginnt, steigen die Level von Cer, S1P und SM in der frühen Degenerationsphase, während eine Reduktion in den kürzeren Fettsäuren und eine Zunahme in den längerkettigen Fettsäuren zu beobachten ist (Stiles et al., 2016).

1.4.8 S1P in der Retina

S1P und die Enzyme und Rezeptoren, die am S1P Signalweg beteiligt sind, sind in den meisten retinalen Zellen vorhanden. So exprimieren Photorezeptoren Sphk1 und humane fetale RPE Zellen beide Sphks (Abraham et al., 2010; Zhu et al., 2010). Allgemein ist eine Sphk1-Expression vor allem in Retina und Sehnerv nachweisbar, Sphk2 dagegen ist in allen okulären Geweben der Maus exprimiert. In der frühen Entwicklung des Auges scheinen beide Sphks in der Retina hochreguliert zu werden. Von den Rezeptoren sind S1PR1 und S1PR3 die am höchsten exprimierten in der Retina und beide sind in Photorezeptoren zu finden. Weiterhin ist S1PR1 stark exprimiert in den RPE Zellen nachweisbar, während S1PR3 in den Ganglionzellen lokalisiert ist (Porter et al., 2018). In den Müllergliazellen sind Sphk1 und S1PR3 nachweisbar und S1P ist notwendig für deren Migration (Simon et al., 2015).

Für die normale Augenentwicklung ist S1P essenziell. Sein Transporter Spns2 ist wichtig für die retinale Morphogenese (Fang et al., 2018) und eine Spns2 Mutation führt zur abnormalen Fusion des Augenlides (Bian et al., 2018). Auch in der Regulation der Proliferation retinaler Zellen ist S1P ein potenter Mediator, sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Gewebe (Donati et al., 2005; Meacci et al., 2008; Mizugishi et al., 2005; Nagata et al., 2006). Das gleiche gilt für die Proliferation, Entwicklung und Differenzierung von Photorezeptoren (Miranda et al., 2009), wo es essentielle Schritte in der Formation der

äußeren Segmente der Photorezeptoren kontrolliert (Lem et al., 1999; Sanyal et al., 1980). Exogene S1P Zugabe schützt Photorezeptoren vor oxidativer Stress-induzierter Apoptose (Miranda et al., 2009) und eine S1P-Vorbehandlung verhindert die, bei Netzhautablösung beobachtbare, Photorezeptorapoptose (Ranty et al., 2009).

Während des retinalen Gefäßwachstums ist die S1PR1-Expression auf ECs beschränkt. Die Signaltransduktion über S1PR1 ist dabei ein wichtiger, wenn auch nicht der einzige, Signalweg der Angiogenese inhibiert und zur Stabilisierung und damit Reifung von Gefäßen beiträgt. Dabei zeigte sich ein S1PR1-Expressiongradient mit den geringsten Werten in den Tip-Zellen der einsproßenden Gefäße und S1PR1 defiziente Mäuse zeigten einen Phänotyp mit starker Gefäßsprossung (*hyper-sprouting*) (Gaengel et al., 2012; Jung et al., 2012).

Wie bereits erwähnt, agiert S1P sowohl als extrazellulärer Ligand wie auch als intrazellulärer Sekundärbotenstoff, sowohl rezeptorunabhängig als auch -abhängig. Weiterhin existiert eine gegenseitige Beeinflussung zwischen S1P und Wachstumsfaktor-aktivierenden Signalkaskaden (Lebman and Spiegel, 2008), wie dem GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*) Signalweg welcher die Proliferation von Vorläuferzellen begünstigt (Politi et al., 2001).

Ebenso ist bekannt, dass neugebildetes S1P über die Aktivierung von S1PR1 und S1PR3 zu einem anhaltendem Ca^{2+} Influx führt. Dieser komplexe S1P-vermittelte Mechanismus könnte an der Freisetzung und den Signalwegen von Neurotransmittern in der inneren Retina beteiligt sein (Crousillac et al., 2009).

S1P ist ein potenter Mediator in der Modulation von Entzündungsvorgängen (Aoki et al., 2016; Snider et al., 2010). So sind in der Rattenretina S1P-Level bei Astrogliose-fördernder Lipopolysaccharid-induzierter Entzündung erhöht (Jang et al., 2007). S1P spielt aber ebenso eine wichtige Rolle in Fibrose (Swaney et al., 2008), der Bildung von Narbengewebe, retinaler und choroidaler NV (Caballero et al., 2009; Skoura et al., 2007) und der Aufrechterhaltung der retinalen Endothelzellenbarriere (Allende and Proia, 2002; McGuire et al., 2011).

Humane RPE Zellen, welche klinische Hauptziele in der Behandlung von subretinaler Fibrose sind, reagieren auf S1P und produzieren es auch selbst, wodurch Proliferation, myofibroblastische Transformation, Collagenproduktion und pro-fibrotische Proteinexpression gefördert wird (Swaney et al., 2008). Dies suggeriert das S1P in der Fibrosekaskade involviert ist und damit zur Narbenbildung in okulären Erkrankungen beiträgt. Durch seine funktionale Diversität schützt S1P z.B. RPE Zellen vor Cer-induzierter Apoptose (Zhu et al., 2010) und die Aktivität der Sphk ist maßgeblich am Überleben von retinalen ECs beteiligt (Maines et al., 2006).

Verschiedene Studien heben den S1P Signalweg als eine der treibenden Kräfte im Auftreten und Verlauf entzündlicher und angiogener Reaktionen in retinalen Erkrankungen hervor. Dabei fördert S1P die Expression von VEGF und HIF-1 in RPE Zellen (Terao et al., 2017) und die Signaltransduktion über S1P/S1PR3 partizipiert in den Veränderung der Perizyten und ECs und fördert damit Angiogenese (Durham et al., 2015; Jin et al., 2018), während NV in ischämischer Retinopathie durch die Reduzierung der S1P Signaltransduktion, z.b. durch einen monoklonalen anti-S1P Antikörper und in S1PR2 *knockout* Mäusen, gemindert wird (Skoura et al., 2007).

Die zentrale Rolle die S1P, seine Rezeptoren und seine metabolisierenden Enzyme in der Regulation kritischer zellulärer Prozesse einnehmen, die in retinalen Pathologien verändert sind, macht diese zu interessanten therapeutischen Angriffspunkten.

1.5 Zielsetzung

Auf der Basis der Erkenntnisse, dass Sphingolipide und insbesondere Sphingosin-1-Phosphat (S1P) eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellüberlebens, aber auch Endothelzell-vermittelter vaskulärer Funktionen, spielen und erste Arbeiten auf eine Modulation des Sphingolipid-Rheostats bei retinalen Erkrankungen hindeuten, war unser Ziel die Untersuchung der Rolle der Sphingosinkinasen. Dabei war insbesondere die, in der Retina auf höherem Niveau exprimierte Sphingosinkinase 2 (Sphk2) in einem retinoproliferativen Erkrankungsmodell von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Sphingolipidmetabolismus in der Netzhaut der Maus unter physiologischer und pathologischer Angiogenese untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Veränderungen im retinalen Gefäßbett im Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) Modell, bedingt durch eine initiale Hyperoxie gefolgt von relativer Netzhauthypoxie.

Hierzu wurden genetisch veränderte Mäuse eingesetzt, in denen entweder ein systemischer Sphk2-Mangel oder -Überschuss vorliegt, und die Veränderungen in der retinalen Vaskularisierung und der pathologischen Angiogenese analysiert, ebenso wie die Expressionen von S1P, dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PRs) und dem metabolisierenden Enzym Sphk2, sowie die retinalen und plasmatischen Konzentrationen verschiedener Sphingolipide.

Um die Mechanismen der in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen der Neovaskularisation (NV) unter Sphk2 Modulation aufzuklären, wurden neben der Expression der fünf S1P-Rezeptoren auch vaskuläre Wachstumsfaktoren, wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und Angiopoietin 1 und 2 (Angpt1 und 2), im OIR Mausmodell und den genetisch modulierten Mäusen analysiert. Hypoxie-induziertes VEGF ist einer der Hauptmediatoren der Angiogenese und NV und damit ein therapeutisches Ziel für proliferative Netzhauterkrankungen, wie sie als Anti-VEGF-Therapie bei Frühgeborenenretinopathie (ROP) zum Einsatz kommt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann VEGF jedoch nicht alleine für den Anstieg an NV in ischämischen Retinopathien verantwortlich sein. Deswegen wurde zudem die Expression des Angpt/Tie Systems analysiert, welches vor allem die Gefäßstabilisierung und -Destabilisierung reguliert, wobei VEGF und Angpt2 gemeinsam NV stimulieren. Das Zusammenspiel dieser angiogenen Faktoren mit dem komplexen metabolischen Netzwerk der Sphingolipide und deren Einfluss auf physiologische und pathologische Angiogenese in der Netzhaut waren zentrale Punkte dieser Arbeit.

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

4% Formaldehyd, Histofix	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Agarose	AppliChem, Darmstadt, DEU
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, DEU
Chloroform	Merck Millipore, Molsheim, Frankreich
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , 2xH ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
DMSO	Thermo Fisher Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DEU
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, DEU
Fluorescence Mounting Medium	DAKO, Hamburg, DEU
Gene Ruler 100bp Ladder plus	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, DEU
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Roti®-Histofix 4 % (Formaldehyd)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Roti®-ImmunoBlock, 10x,	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Salzsäure	Roche GmbH, Mannheim, DEU
Triton X-100	Appllichem, Darmstadt, DEU
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU

2.1.2 Tierexperimentelle Durchführung und Präparation

2.1.2.1 Medikamente und Lösungen

BSS Plus® Spüllösung	Alcon, Fort Worth, Texas USA
Conjunctacon® EDO®	Dr. Mann Pharma und Baum & Lomb GmbH, Berlin, DEU
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, DEU
Mydriaticum Stulln®	Pharma Stulln GmbH, Stulln, DEU
Neonsynephrin-POS®	Ursapharm, Saarbrücken, DEU
Tobramaxin® Augensalbe	Alcon Pharma GmbH, Freiburg, DEU

2.1.2.2 Operationsbesteck

Dumont #5 Mirror Finish Pinzette	Finescience, Heidelberg, DEU
Federschere n. Vannas, gebogen	Geuder AG, Heidelberg, DEU
Federschere Vannas, gerade	Geuder AG, Heidelberg, DEU
Mikro-Kolibripinzette mit Fadenplatte	Geuder AG, Heidelberg, DEU
Nadel Hamilton RN NDL 34G/10mm/4Pt.	Hamilton, Höchst, DEU
Spritze Hamilton (Modell 62 RN '2,5µl'/26S)	Hamilton, Höchst, DEU

2.1.3 Molekularbiologie

2.1.3.1 Verwendete Kits und Enzyme

5x Phusion HF Puffer	Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
Desoxyribonuklease 1 (DNase) RNase frei	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DEU
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
MasterPure™ Complete DNA&RNA Purification Kit	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DEU
Oligo (dT) ₁₅ Primer	Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Proteinase K	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DEU
QuickExtract DNA Extraction Solution	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DEU
ReverdAid Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
RevertAID First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, DEU

2.1.3.2 Taqman® -Lösungen und Sonden

Absolute Blue QPCR LowRox Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Hs00219999_m1 (hSphk2 - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm00437304_m1 (VEGFα - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm00445021_m1 (mSphk2 - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm00456503_m1 (Angpt1 - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm00545822_m1 (Angpt2 - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm00725701_s1 (Glul - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm01194024_g1 (gSphk2 - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm01253033_m1 (GFAP - FAM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU
Mm99999915_g1 (GAPDH - VIC)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DEU

2.1.3.3 Sonstige Lösungen

6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, St.-Leon-Rot, DEU
GelRed™	Biotium, Fremont, Kanada
Quick Extract DNA Extraktions Lösung	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DEU

2.1.4 Histologie

2.1.4.1 Antikörper

Primärantikörper

Anti Iba1	Wako, Osaka, Japan
Anti-COX2 /Cyclooxygenase 2	abcam, Cambridge, UK
Anti-F4/80	abcam, Cambridge, UK
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein	Merck Millipore, Molsheim, Frankreich
Anti-Glutamin Synthetase	BD Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgien
Anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan	Merck Millipore, Molsheim, Frankreich
Anti-Sphk2	abcam, Cambridge, UK
Anti-Vimentin (Clone Vim 2B4)	Dako, Glostrup, Dänemark
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Lectin (Bandeiraea simplicifolia)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
TRITC konjugiert	

Sekundärantikörper

Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594)	abcam, Cambridge, UK
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	abcam, Cambridge, UK

2.1.4.2 Sonstige Lösungen

DAKO Antibody Diluent with Background reducing Components	DAKO, Hamburg, DEU
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Hamburg, DEU
DAKO Target Retrieval solution	DAKO, Hamburg, DEU
PAP Pen	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, DEU
Roti® Immunoblock	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Roti®-Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU

2.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

10x PBS-Puffer	139 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2xH ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Pblec-Puffer	1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 1 % Triton-X 100 In 1x PBS
DEPC-Wasser	1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) ad 1 l Milli-Q-Wasser über Nacht rühren, anschließend autoklavieren
50x TAE-Puffer	57 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1 L dH ₂ O

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

15 ml / 50 ml Falcons	Greiner bio-one, Solingen, DEU
96-Well Platte	Greiner bio-one, Solingen, DEU
Deckgläser (18x18 mm)	Menzel, Braunschweig, DEU
Deckgläser (24x60 mm)	Menzel, Braunschweig, DEU
Einbettkassetten	Sanowa, Leimen, DEU
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Fast Optical 96-Well reaction plates	Applied Biosystems®, Darmstadt, DEU
Mikrovette (Tri-Kalium-EDTA beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig, DEU
Pasteur Glaspipetten	WU, Mainz, DEU
Petrischale, 10cm	Greiner bio-one, Solingen, DEU
Pipettenspitzen (1000, 200, 20, 10, 2µl)	Eppendorf AG, Hamburg, DEU

2.1.7 Geräte

ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Darmstadt, DEU
Biofuge fresco (Tisch-Kühlzentrifuge)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DEU
Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd, DEU
E445 Sensor	BioSpherix, Ltd., New York, USA
Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020	Leica, Nussloch, DEU
GNA 100 Elektrophoresekammer (DNA)	Pharmacia Biotech, Braunschweig
Keyence BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, DEU
Luna C18 Säule	Phenomenex, Aschaffenburg, DEU
Massenspektrometer API4000	Sciex, Darmstadt, DEU
Mikrotom	Leica, Nussloch, DEU
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DEU
OxyCycler Sensor	BioSpherix, Ltd., New York, USA
Paraffineinbettstation	Leica, Nussloch, DEU
Stereomikroskop (Stemi SV6)	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, DEU
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Vortexer	Heidolph instruments, Schwalbach, DEU
Waage Kern 572	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DEU

2.1.8 Computersoftware

ABI PRISM 7500 System SDS-Software	Applied Biosystems®, Darmstadt, DEU
Adobe Photoshop Elements	Adobe Systems, Kalifornien, USA
AngioTool	NCI (NIH), USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA
ImageJ	NIH, USA
ImageJ Makros für NV Quantifizierung	Andreas Stahl, Freiburg, DEU
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Washington, USA
BZ-H2AE (Keyence BZ-9000 Analysesoftware)	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, DEU

2.2 Methode

2.2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes durch das Veterinärdezernat des Regierungspräsidiums Darmstadt genehmigt (Genehmigungsnummer: F143/73). Die Haltung aller Versuchstiere entsprach dem in §9 TierSchG vorgegebenen Tierhaltungsbestimmungen und erfolgte am Satellitenstandort der Zentralen Forschungseinrichtung (*core facility*, Haus 26) des *vascular research centre* am Universitätsklinikum Frankfurt. Die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes wurden bei allen Tierversuchen eingehalten.

Alle Versuchstiere wurden in einer pathogenarmen Umgebung mit 12h Nacht/12h Tag Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Alle Tiere für die Experimente wurden in der *core facility* gezüchtet.

2.2.1.1 C57BL/6J Mäuse (WT)

Die in den Experimenten verwendeten C57BL/6J Mäuse wurden von Charles River GmbH, Sulzfeld bezogen. Hierbei handelt es sich um einen syngeneten (genetisch identischen) immunkompetenten Mausstamm. Die Tiere wurden unter den gleichen Bedingungen wie die unten aufgeführten genetisch veränderten Mäuse am Satellitenstandort der zentralen Forschungseinrichtung in die Zucht genommen und nur die Jungtiere im Alter von P7 bis P17 für die Versuche verwendet.

2.2.1.2 Sphk2 *knockout* Mäuse (Sphk2^{-/-})

Die Generierung der Sphingosinkinase 2 (Sphk2) *knockout* Mäuse wurde von GenOway® (Lyon Cedex, France) wie bereits von Hofmann et al. (2008) beschrieben durchgeführt. Zur Herstellung eines Inaktivierungsvektors der zu einer Mutation des Sphk2 Gens führt, wurde an die Stelle der Exone 4-7 ein Neomycin-Phosphotransferasegen eingesetzt, das zur späteren Selektion der Zellen diente. Anschließend erfolgte der Transfer des Inaktivierungsvektors in embryonale Stammzellen (129Ola) und die Generierung der Sphk2 Gen-*knockout* Mäuse durch Elektroporation der Zellen in C57BL/6-Blastozysten. Die chimäre „*Founder*“-Generation mit heterozygotem Sphk2 Depletionsstatus wurde durch Einsatz in scheinchwangere Leihmütter erzeugt. In der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE), Frankfurt, wurden diese dann verpaart. F0-Männchen wurden mit C57BL/6 Weibchen verkreuzt, die daraus resultierende F1-Generation der Mäuse bestand aus nichtdepletierten Wildtypmäusen und aus heterozygoten Sphk2 *knockout* Mäusen. Zur Erlangung eines einheitlichen genetischen Hintergrundes der Zuchtiere wurde, eine konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung (Inzucht) vorgenommen. Es wurden

homozygote Tiere der Linie Sphk2^(-/-) verwendet. Bei dieser Linie standen Tiere, die auf einen C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzt wurden, zur Verfügung, deshalb wurden C57BL/6J Tiere als Kontrollen verwendet.

2.2.1.3 EllaCrexJos5a Mäuse (tgSphk2)

Die Sphk2 überexprimierenden Mäuse wurden von GenOway® (Lyon Cedex, France) im Auftrag des Instituts für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, *pharmazentrum frankfurt*, generiert. Für die vorliegende Arbeit wurden Zuchtpaare zur Verfügung gestellt und am Satellitenstandort der Zentralen Forschungseinrichtung gehalten und gezüchtet. Für die durchgeführten Versuche wurden nur die Jungtiere verwendet. Die Überexpression der Sphk2 in diesen Mäusen basiert auf einem Gen-*knockin* des humanen Sphk2 Gens in das Genom der Maus. Durch homologe Rekombination wurde die cDNA des humane Sphk2 Gen unter der Kontrolle des ubiquitären CAG Promotors in den *Hprt* Locus eingeschrieben. Zwischen Promoter und cDNA wurde eine gefloxt Stoppkassette eingebaut um die Cre-unabhängige Expression des humanen Sphk2 Gens zu ermöglichen (Abb. 14). Durch Injektion in Blastozysten wurden Chimären erschaffen, die homozygot waren. Diese homozygoten Mäuse mit humanen Sphk2 Gen und C57BL/6J Hintergrund wurden mit B6.FVB-Tg (Ella-Cre)C5379Lmgd/J Mäusen (Jackson Lab.: # 003724) gekreuzt. Diese weisen ein *Cre*-Transgen, welches unter der Kontrolle des Adenoviruspromotor Ella steht. Die Verpaarung mit Ella-Cre Mäusen resultierte in einer Deletion der *loxP*-flankierten Stoppkassette und der anschließenden Überexpression des humanen Sphk2 Gens in fast allen Geweben. Es wurden homozygote Tiere der Linie EllaCrexJos5a (tgSphk2) verwendet. Bei dieser Linie standen ebenfalls Tiere, die auf einen C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzt wurden, zur Verfügung. C57BL/6J Tiere wurden als Kontrollen verwendet.

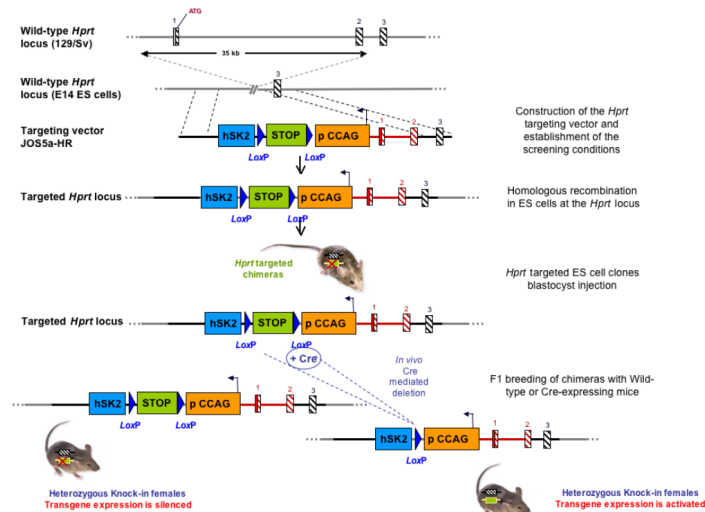


Abb. 14 Konstruktion und Durchführung des *knockins* des humanen Sphingosinkinase 2 Gens. Durch homologe Rekombination und mit anschließender Deletion der Stoppkassette unter der Verwendung des Cre-Lox System wurde die Überexpression der Sphk2 erzeugt. (Eresch et al., 2018).

2.2.1.4 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäuse wurden entweder Schwanzspitzenproben oder Ohrlochproben verwendet. Diese wurden kleingeschnitten und mit 200 µl QuickExtract DNA Extraction Solution 1.0 versetzt. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte bei 65°C für 6 min, nach anschließendem Vortexen, wurde die Reaktion bei 98°C für 2 min gestoppt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Als Kontrollen wurden jeweils Proben von C57BL/6 WT Mäusen mitgeführt.

2.2.1.4.1 Genotypisierung der EllaCrexJos5a Mäuse

Bei tgSphk2 Proben wurde die genomische DNA mittels PCR vervielfältigt und im Agarosegel ausgelesen. Der Mastermixansatz setzt sich hierbei pro Probe wie folgt zusammen:

5x Phusion HF Puffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Primer A <i>forward</i> (10 µM)	1 µl
Primer A <i>reverse</i> (10 µM)	1 µl
Primer B <i>forward</i> (10 µM)	1 µl
Primer B <i>reverse</i> (10 µM)	1 µl
100% DMSO	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	6,9 µl
Phusion DNA Polymerase 2U/µl	0,2 µl

Es ergibt sich ein Mastermixvolumen von 16 µl pro Probe. Eingesetzt werden 4 µl DNA-Lösung. Durch kurzes Vortexen wurde der Ansatz gemischt, entstandene Blasen wurden durch kurzes Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge entfernt. Die PCR fand in einem Thermocycler statt. Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	} 40 Zyklen
Denaturierung	98°C	10 sec	
Annealing	Primer spezifische Temperatur	30 sec	
Extension	72°C	20 sec	
Finale Extension/	72°C	10 min	
Hitzedesaktivierung			

Die Annealingtemperatur ist abhängig vom GC Gehalt der Sequenz des jeweiligen Primers und der sich daraus ergebenden T_m und variiert dementsprechend. Für die tgSphk2 Mausgenotypisierung wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 1 Genotypisierungsprimer

Wt Hprt <i>forward</i>	TGTCCTTAGAAAACACATATCCAGGGTTT AGG	345 bp	65,6°C T _m
Wt Hprt <i>reverse</i>	CTGGCTTAAAGACAACATCTGGGAGAAAA A	345 bp	64°C T _m
Jos5a <i>forward</i>	TAAGGGTGAGGGCAAAGCGTGG	270 bp	64°C T _m
Jos5a <i>reverse</i>	GGGCAACGTGCTGGTTATTGTGC	270 bp	64,2°C T _m

Daraus ergibt sich für diese Proben eine Annealingtemperatur von 67°C. Zum Auftrennen der PCR-Produkte wurde ein RotiSafe haltiges 1,7 %iges (w/v) Agarose-Gel verwendet, welches mit 0,05% GelRed versetzt wird. Das abgekühlte und mit GelRed versetzte Gel wurde in eine vorbereitete abgedichtete Gelkammer gegossen. Ein entsprechender Kamm wurde eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. In die Taschen des Gels wurden 10 µl der mit Loading Dye vermischten Proben und 3 µl des 100 bp Gene Ruler Plus DNA Lader pipettiert. Die Proben wurden bei 90 V für ca. 45 min aufgetrennt. GelRed interkaliert in die DNA so dass nach der Auftrennung die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden können.

2.2.1.4.2 Genotypisierung der Sphk2^{-/-} Mäuse

Zur Genotypisierung der *knockout* Mäuse wurde die durch QuickExtract gewonnene DNA mittels semiquantitativer *real-time* PCR untersucht. Hierfür wurde die DNA Konzentration der Proben am Nanodrop ermittelt. Es wurden 0,2 µg DNA eingesetzt die mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 11 µl ergänzt wurden. Der weitere Verlauf der *real-time* PCR geschieht wie unter Kapitel 2.2.4.5 beschrieben.

2.2.2 Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie

Im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie wurden neonatale Mäuse mit dem Muttertier vom postnatalen Tag 7 (P7) bis Tag 12 (P12) in einer Sauerstoffkammer einer Atmosphäre mit stark erhöhter Sauerstoffkonzentration (75%) ausgesetzt. Vermittelt über die Atmung der sauerstoffreichen Luft kommt es zur Hyperoxie in den Geweben, die in der Retina zu Gefäßverschlüssen und Gefäßverlust führt, wodurch sich eine avaskuläre Zone (VO-Zone) im zentralen Teil der Retina bildet.

Nach dieser ersten hyperoxischen Phase (bis P12) wurden die Tiere wieder zur Raumluft (21% O₂) überführt. Diese zweite Phase der relativen Hypoxie dauerte von P14 bis P17.

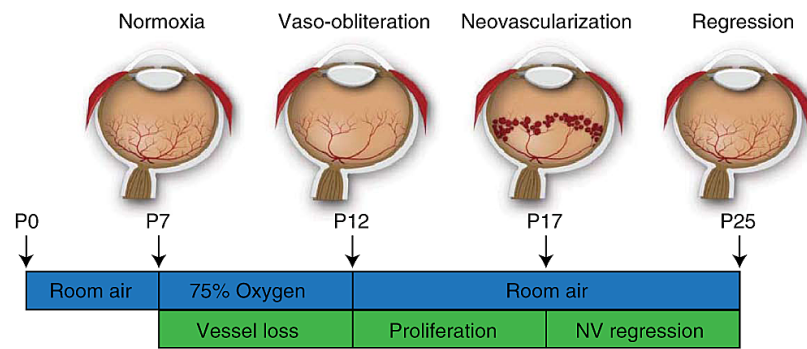


Abb. 15 Schematische Darstellung des OIR Modells in der Maus. Neonatale Mäuse werden mit dem Muttertier bis P7 in Raumluft gehalten, wodurch eine normale Gefäßentwicklung stattfindet. Von P7 bis P12 werden die Mäuse 75% O₂ ausgesetzt, was durch Gewebhyperoxie zu Gefäßverschluss und -verlust im zentralen Bereich der Retina führt. An P12 werden die Mäuse wieder in Raumluft überführt. Die avaskuläre Retina wird hypoxisch (P14), wodurch kompensatorisch eine pathologische neovaskuläre Antwort ausgelöst wird. An P17 erreicht die NV ihr Maximum. Danach kann bis P25 eine spontane Regression der NV beobachtet werden. (Connor et al., 2009).

Als Reaktion auf die relative Gewebshypoxie kam es zu einer kompensatorischen Gefäßneubildung, sowohl durch Revaskularisation wie als auch Neovaskularisation (NV). Die NV geschah jedoch unkontrolliert und chaotisch und erreichte an P17 ihr Maximum (siehe Abb. 15 und Kapitel 1.2.2).

Die Durchführung der Tierversuche fand am Satellitenstandort der Zentralen Forschungseinrichtung (*core facility*, Haus 26) des *vascular research centre* am Universitätsklinikum Frankfurt statt. Hier waren bereits gasdichte Kammern vorhanden, mit denen die Mäuse über fünf Tage in einer 75% Sauerstoffumgebung gehalten werden konnten (siehe Abb. 16). Dafür wurden die Jungtiere mit dem Muttertier in einen neuen Käfig mit ad libitum Zugang zu Futter und Wasser gesetzt. Danach wurde der Käfig mit den Tieren in eine der Kammern platziert (Abb. 16 B), diese verschlossen und die Sauerstoff- und Stickstoffflaschen geöffnet (Abb. 16 A). Zur Regulierung des Sauerstoffgehaltes in der Kammer wurde das mit den Oxycylern und den Sensoren in der Kammer verbundene Computerprogramm auf 75% O₂ Soll eingestellt.



Abb. 16 Sauerstoffkammersystem. (A) Jeweils 2 Sauerstoff- und 2 Stickstoffgasflaschen waren mit dem Oxycyler verbunden. Dieser leitete automatisch die jeweilig benötigte Gasmenge in die ausgewählte Kammer. (B) 4 Kammern standen zu Verfügung. In jede Kammer passten gleichzeitig max. 4 Mäuse. (Eigene Bilder).

Das Programm regulierte dann automatisch die nötige Zugabe, um diesen Sauerstoffgehalt aufrechtzuerhalten. Während der 5 Tage Versuchsdauer wurde die Kammer nicht geöffnet. Erst zum Entnehmen der Versuchstiere an P12 wurde der Sauerstoffinput gestoppt, die Gasflaschen geschlossen und die Kammer geöffnet. Nach Probenentnahme wurden die übrigen Jungtiere mit Muttertier in einen frischen Käfig gesetzt und in den normalen, direkt mit dem Kammerraum verbundenen Haltungsraum zu den Kontrollen gebracht. Die unbehandelten Kontrollwürfe wurden während der Versuchsdauer in diesem direkt angrenzenden Raum gehalten, ohne jedoch in die Kammer gestellt zu werden. So hatten diese jedoch weitgehend die gleiche Umgebung hinsichtlich Gerüche und Geräuschen sowie weiteren Umgebungsfaktoren wie die behandelten Würfe.

2.2.2.1 Entnahme der Gewebeproben

Zur Probenentnahme an P7, P12, P14 und P17 wurden die jeweiligen Mäuse mit Isofluran betäubt und durch Dekapitation getötet. Die an P7, P12 und manchmal auch noch an P14 geschlossenen Augenlider wurden vorsichtig mit einer feinen Federschere geöffnet. Danach wurde das Auge mit einer gebogenen Pinzette aus der Augenhöhle geschält und entweder zur Fixierung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 4% Histofixlösung (Formaldehyd) oder, wenn eine nicht fixierte Retina benötigt wurde, in ein Eppendorfgefäß mit 1x PBS auf Eis überführt. Mit dem zweiten Auge wurde ebenso verfahren.

2.2.2.2 Entnahme der Blutproben

Zur Blutentnahme wurden mit EDTA beschichtete Microvetten der Firma Sarstedt verwendet. Direkt nach Isofluranbetäubung und Dekapitation wurde das aus geöffneten Gefäßen austretende Blut aufgefangen. Die EDTA-beschichteten Probenröhrchen mit Blut wurden vorsichtig invertiert, um Gerinnen zu verhindern. Die Blutproben wurden bei 2000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert, um Blutplasma und zelluläre Bestandteile zu trennen. Das Blutplasma wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Retinaflachpräparate: Präparation und Färbung

Nach Entnahme der Augen wurden diese für 1 h bei RT in 4% Histofixlösung (Formaldehyd) fixiert. Anschließend konnten sie für maximal 2 Wochen in 1x PBS bei 4°C aufbewahrt werden. Die Herstellung der Retinaflachpräparate (*Flatmounts*) geschah nach dem angepassten Protokoll von Connor et al. (2009) unter einem Stereomikroskop.

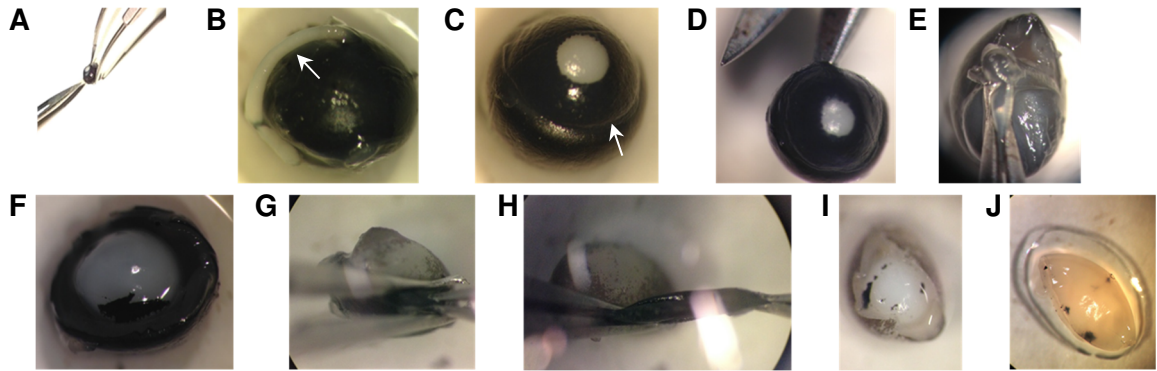


Abb. 17 Präparation der Retina aus dem Mausauge. Das isolierte Mausauge (A) wurde unter einem Stereomikroskop platziert, der Sehnerv (B, weißer Pfeil) entfernt und das Auge entlang der *ora serrata* (C, weißer Pfeil) mit einer Federschere geöffnet (D). Der obere Teil mit Cornea und Iris wurde verworfen (E), so dass nur noch der untere Augenbecher mit Sklera, Pigmentepithel, Retina und Linse vorliegt (F). Das Pigmentepithel wird vorsichtig mit einer Pinzette am Rand gegriffen und von der Retina separiert, indem es durch die halb geöffnete zweite Pinzette gezogen wird. Dabei wird mit der zweiten Pinzette, die leicht auf der Retina aufliegt, auf diese leichten Druck ausgeübt, um sie an der Linse zu halten (G+H). Retina und Linse bleiben übrig (I). Die Linse wird vorsichtig entfernt und die leicht gewölbte Retina liegt in einem Stück vor (J). (Eigene Bilder).

Als erster Schritt musste der Sehnerv (Abb. 17 B, weißer Pfeil) entfernt werden, danach wurde das Auge vorsichtig entlang der *ora serrata* (Abb. 17 C, weißer Pfeil) mit einer feinen Federschere geöffnet. Der obere Teil mit Cornea und Iris wurde entfernt und verworfen, so dass nur noch die Sklera, das Pigmentepithel (PE), die Retina und die Linse vorlagen (Abb. 17 F). Nun musste das PE von der Retina getrennt werden. Hierfür wurde das PE vorsichtig am Rand mit einer Pinzette gegriffen und leicht angehoben. Die zweite Pinzette wurde, leicht geöffnet, direkt um das angehobene PE herumgelegt. Mit der ersten Pinzette wurde das PE dann vorsichtig durch die zweite Pinzette gezogen, während mit dieser die Retina durch leichten Druck auf der Linse gehalten wurde (Abb. 17 G+H). Nach erfolgreicher Entfernung des PEs, konnte die Linse entnommen und die vollständige leicht gewölbte Retina (Abb. 17 J) in eine 96-Well Platte mit vorgelegten 1x PBS überführt und maximal 2 Tage gelagert werden.

Zur Färbung der Retina wurde diese in Pblec-Puffer für etwa 10-15 min geblockt. Zum Anfärben wurden pro Retina 100 µl Färbelösung (1 mg/ml TRITC-gekoppeltes Lectin in Pblec-Puffer 1:100) angesetzt. Der Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und die Retinae mit der Färbelösung bedeckt. Anschließend wurde die 96-Well Plate zum Schutz gegen Licht mit Alufolie umwickelt und über Nacht auf dem langsam rotierenden Schüttler bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurde die Färbelösung verworfen und die Retinae dreimal mit 1x PBS gewaschen.

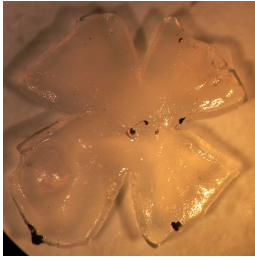


Abb. 18 retinales Flachpräparat. Nach Herauspräparieren der Retina aus dem Auge und Lectinfärbung wurden vier Schnitte gesetzt, um die gewölbte Retina flach ausbreiten zu können. (Eigenes Bild).

Zum Flachpräparieren der Retina, wurde diese nach dem Färben auf einen Objektträger platziert und vier Schnitte gesetzt, um das Gewebe flach ausbreiten zu können (Abb. 18), anschließend wurden eventuell noch vorhanden Hyaloidgefäße entfernt. Danach wurde die nun flachliegende Retina mit Mountingmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Über Nacht wurden die Flachpräparate bei 4°C getrocknet und dann unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.3.2 Retinaflachpräparate: Bildaufnahme und Auswertung

Die Bildaufnahmen der Lectin-gefärbten *flatmounts* wurde an einem Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Dunkelkammer im Gehäuse vorgenommen. Hierfür wurden entlang der x-, y- und z-Achse des Bildes, angefangen mit der oberen linken Präparatecke, 5x5x5 Einzelbilder aufgenommen. Diese wurden mithilfe der Keyence Analysesoftware zuerst in der z-Achse verarbeitet und dadurch fokussiert und dann in der x- und y-Achse zu einem Gesamtbild (*merge*) zusammengesetzt.

2.2.3.2.1 *Branching point* Analyse

Die *branching points* (Verzweigungspunkte der Blutgefäße) Analyse wurde an P7 Retinae und der freien Software AngioTool (Zudaire et al., 2011) durchgeführt. AngioTool ist eine freie Software zur quantitativen Analyse der Angiogenese.

Die Bilder der Lectin-gefärbten Retinae wurden wie oben beschrieben aufgenommen und im AngioTool Programm geöffnet. Für die Auswertung wurde zuerst der Maßstab für die Kalibrierung benötigt (Abb. 19 A), danach werden die Parameter (Abb. 19 B) so eingestellt, dass Kapillargefäße detektiert werden, jedoch keine Hyaloidgefäße (falls vorhanden). Weiterhin werden mitgefärbte Zellen oder Färbefragmente durch die Option *Remove small particles* ausgeschlossen. Durch die Option *Fill holes* können nicht ausgewählte Bereiche in den Gefäßen aufgefüllt werden. Der Parameterbereich wurde für alle Bilder wie folgt gleich eingestellt:

Vessel diameter	6-10
Intensity	8-255
Remove small particles	350-500
Fill holes	100-300

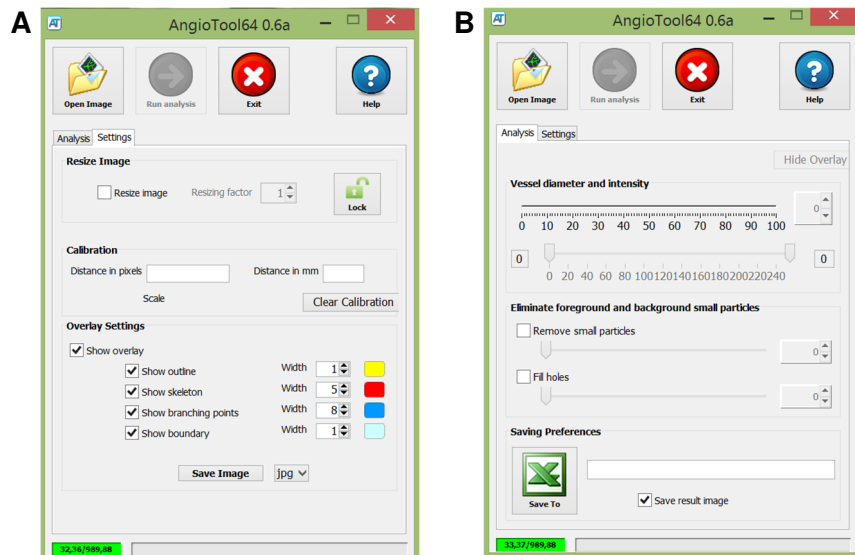


Abb. 19 Oberfläche der AngioTool Software. Mit AngioTool können die *branching points* automatisch und reproduzierbar gezählt werden. Dabei muss die Kalibrierung (A) sowie der Parameterbereich (B) für alle Bilder gleich sein. Die Feineinstellung der Parameter wurde für jedes Bild angepasst. (Zudaire et al., 2011).

Die Feineinstellung im Parameterbereich wurde an das jeweilige Bild angepasst. Nach Analyseende speicherte das Programm ein *overlay* Bild und eine Excel-Datei ab. Im *overlay* Bild wurden das Gefäßgerüst und die Gefäßverzweigung angezeigt (Abb. 20 B), in der Excel-Datei die eingestellten Parameter und die Analyseergebnisse (Abb. 20 C). Neben der Anzahl der *branching points* (Total Number of Junctions) können noch weitere Daten erhoben werden, die für die vorliegende Arbeit jedoch nicht verwendet wurden.

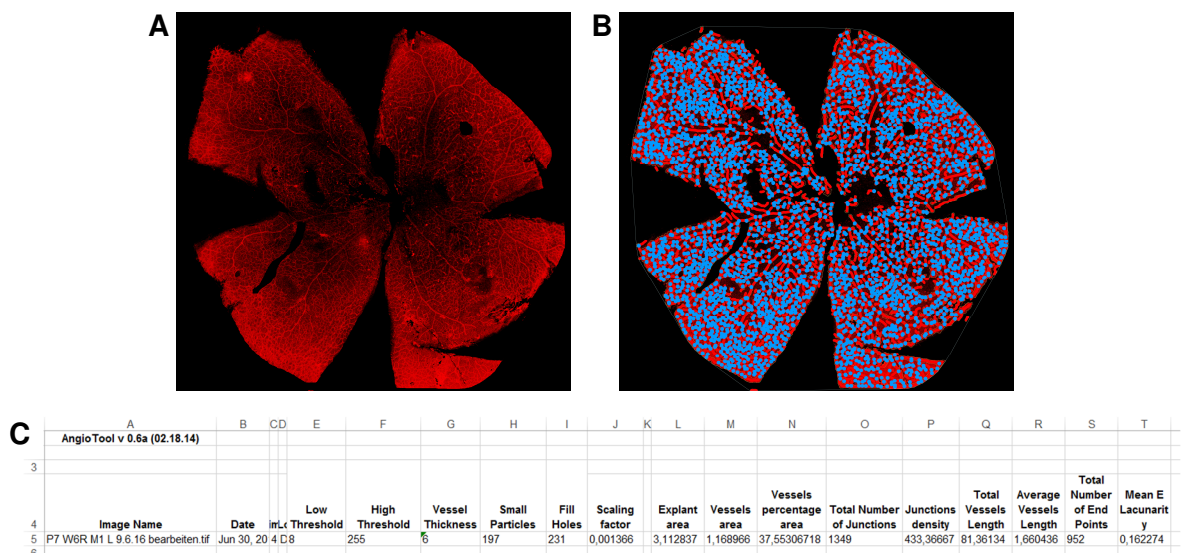


Abb. 20 Beispiel eines Ergebnisses einer branching point Analyse mithilfe der AngioTool Software. Im Ausgangsbild (A) wurden die Parameter festgelegt, mit denen das Blutgefäßgerüst (B, rote Linien) und die *branching points* (B, blaue Punkte) ermittelt wurden und als *overlay* angezeigt werden. Die Analyseergebnisse wurden automatisch als Excel-Tabelle ausgegeben (C). Die Anzahl der *branching points* wird als *Total Number of Junctions* angezeigt. (Eigene Bilder).

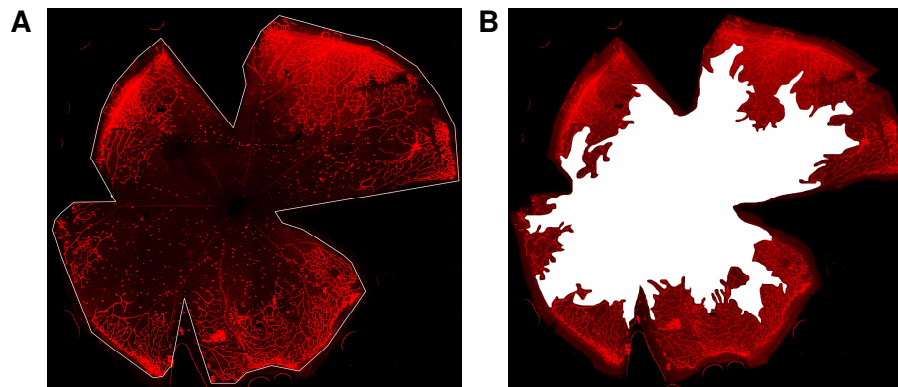


Abb. 21 Analyse der Vaso-Obliteration (VO). Zur Ermittlung des Gefäßverlustes wurde die Gesamtretnafläch (A) und die Fläche der avaskulären Zone (B) ausgemessen. Die Fläche der avaskulären Zone wurde dann auf die Gesamtretnafläch bezogen, um den prozentualen Anteil zu ermitteln. (Eigene Bilder).

2.2.3.2.2 Gefäßverlustanalyse (VO-Analyse)

Einer der Hauptausleseparameter im OIR Modell ist die Analyse der Vaso-Obliteration (VO) während der Hyperoxiephase. Die Analyse wurde nach dem gleichen Vorgehen, wie von Connor et al. (2009) beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde die gefäßfreie Zone (Abb. 21 B) im zentralen Bereich der Retina, die unter Hyperoxie durch Gefäßverlust entsteht, mithilfe des Programms Adobe Photoshop in Pixeln ausgemessen und gegen die Gesamtretnafläch (Abb. 21 A) aufgerechnet um den prozentualen Anteil zu ermitteln. Die Analyse wurde mit P12, P14 und P17 Retinae durchgeführt. In den Bildern mit der ausgewählten avaskulären Zone wurde diese weiß ausgefüllt und als VO-Bilder gespeichert. Die Abnahme der avaskulären Zone in diesem Bereich ist ein allgemein akzeptiertes Maß für das Ausmaß der Gefäßneubildung.

2.2.3.2.3 Neovaskularisationsanalyse (NV-Analyse)

Daneben wird das Ausmaß pathologischer Neovaskularisation mit chaotischen Gefäßbündeln (*tufts and cluster*) analysiert. Die quantitative Auswertung der NV erfolgte computergestützt semiautomativ mithilfe des von Andreas Stahl zur Verfügung gestellten SWIFT_NV Plugins und Makros für ImageJ (Stahl et al., 2009). Hierfür wurde die Gesamtretnafläch, die bereits für die Gefäßverlustanalyse ermittelt wurde, benötigt. Des Weiteren wurden die VO-Bilder benötigt, in denen die avaskuläre Zone weiß ausgefüllt wurde (siehe Abb. 21 B) und diese mussten im gleichen Ordner wie die original Retinabilder mit bestimmten Bildnamensendung gespeichert sein. Das Originalbild wurde mit ImageJ geöffnet und nach dem SWIFT_NV Protokoll von Andreas Stahl mit den Makros bearbeitet und analysiert. Hierbei wurden das dazugehörige VO-Bild geladen und in 4 Bilder gesplittet, für jeden „Flügel“ der *flatmounts* eines (Abb. 22 C).

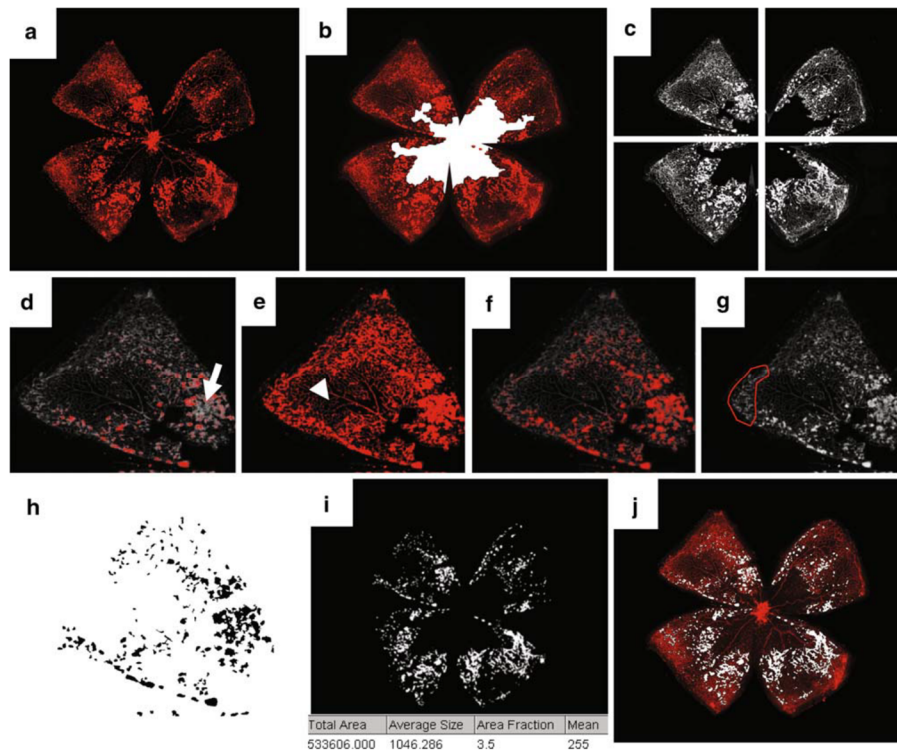


Abb. 22 Computergestützte semiautomatische Quantifizierung der NV. Zur NV-Analyse wurden beide Bilder benötigt, das Retina Originalbild (a) und das VO-Bild (b). SWIFT-NV teilte das Retinabild automatisch in vier Quadranten und subtrahierte die Hintergrundfluoreszenz (c). Im nächsten Schritt musste ein Intensitätsschwellenwert für jeden Quadranten einzeln festgelegt werden. Bei zu hoch angesetztem Schwellenwert wurden NV *tufts and clusters* ausgelassen (d, Pfeil). Bei zu gering gewähltem Schwellenwert wurden normale Blutgefäße miteinbezogen (e, Pfeilkopf). Bei korrekt gesetztem Schwellenwert wurden *tufts and clusters* miteinbezogen jedoch keine normalen Blutgefäße (f). In diesem Schritt konnten individuell per Hand Bereiche markiert werden, die von der Quantifizierung ausgeschlossen werden sollten, wie Hyaloidgefäße, hyperfluoreszierende Ränder der Retina oder auch fluoreszierende Ablagerungen (g). SWIFT_NV quantifizierte dann automatisch alle Pixel im Bild, die über dem gesetzten Schwellenwert liegen und Teile eines Objekts waren, dass mindestens 100 Pixel beinhaltete. Dadurch konnten kleine hyperfluoreszierende Artefakte (z.B. *branching points*) ausgeschlossen werden (h). Nach der Quantifizierung wurden alle vier Quadranten des Retinabildes wieder zusammengesetzt und die totale NV Pixelanzahl angezeigt (i). Als letzten Schritt wurde ein *overlay* des Originalbildes mit dem NV-Bild erstellt und gespeichert (j). (Stahl et al., 2009).

Nach Festlegung eines Intensitätsschwellenwertes wurde die NV-Zonenfläche automatisch in den einzelnen „Flügeln“ der Retina ermittelt, die Bilder wieder zusammengesetzt und die ausgewählte NV-Fläche im Originalbild als *overlay* angezeigt, während als Ergebnis die Gesamtneovaskularisationsfläche in Pixeln angegeben wurde (Abb. 22). Die so ermittelten Werte konnten dann zur Retinagesamtfläche, die vorher ermittelt wurde (siehe Kapitel 2.2.3.2.2), in Bezug gesetzt werden um den prozentualen Anteil der NV in der jeweiligen Retina zu ermitteln. Die Analyse wurde nur mit P14 und P17 Retinae durchgeführt, da erst ab P14 NV induziert und messbar wird.

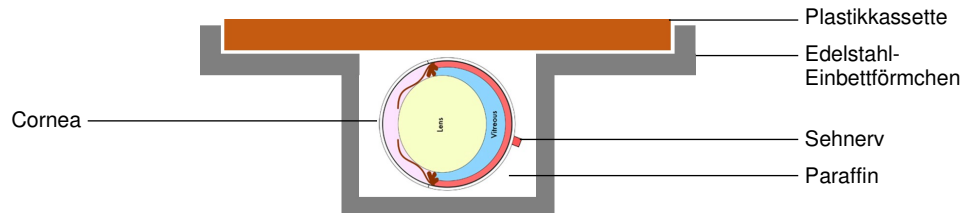


Abb. 23 Paraffineinbettungschema. Das fixierte und paraffinierte Auge wird in einem Edelstahl-Einbettförmchen mit der angezeigten Ausrichtung der Cornea und des Sehnervs mit Paraffin überzogen und mit einer Plastikkassette abgedeckt (nach Skeie et al. (2011)).

2.2.3.3 Paraffinierung von Mäusaugen

Nach Entnahme der Augen wurden diese für 1 h bei RT mit 4% Formaldehyd fixiert und anschließend in 1x PBS bei 4°C bis maximal 2 Wochen gelagert.

Zur Paraffinierung werden fixierte ganze Augen in eine Plastikkassette überführt und in einer automatischen Gewebeeinfiltrationsmaschine mit 50%, 75%, 90%, 96% und 100% Ethanol, Isopropanol, Xylol dehydriert und schlussendlich mit Paraffin infiltriert. Danach konnten die Proben in Einbettförmchen aus Edelstahl überführt, mit flüssigem Paraffin überzogen und mit einer Plastikkassette abgedeckt werden. Dabei wurde besonders auf die Ausrichtung der Augen geachtet (Abb. 23). Anschließend wurden diese zum Aushärten auf eine Kühlplatte überführt. Nach dem Aushärten wurden die im Paraffinblock eingebetteten Augen mitsamt der Plastikkassette vom Einbettförmchen getrennt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3.4 Herstellung von Dünnschnittpräparaten

Die 3 µm dicken Dünnschnittpräparate wurden mithilfe eines Mikrotoms hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass auf jedem Objektträger mindestens 4 Schnitte waren, die aus unterschiedlichen Bereichen des Auges – peripher und zentral – stammten. Dies wurde durch das Durchrotieren der Objektträger bei der Aufnahme der Schnitte aus dem warmen Wasserbad gewährleistet. Zwischen dem Schneiden wurden die Proben immer wieder bei -18°C gekühlt, damit das Paraffin nicht zu weich wurde. Anschließend wurden sie über Nacht auf einer warmen Heizplatte getrocknet.

2.2.3.5 Immunhistochemie

Um einzelne Proteine wie Transkriptionsfaktoren, Zellmarker oder andere Zellbestandteile zu detektieren, können immunhistochemische Färbungen verwendet werden. Dabei bindet ein Primärantikörper an einem spezifischem Epitop des jeweiligen Proteins. Ein Sekundärantikörper weist diese Bindung nach. Dieser ist mit einem Fluorophor gekoppelt und kann so durch Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert werden. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte als erstes deparaffiniert. Dafür

wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Xylol zur Paraffinextrahierung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte hydrophilisiert indem sie zweimal für 5 min in Isopropanol, zweimal für 5 min in Ethanol und einmal für 5 min in 70% Ethanol inkubiert wurden.

Nach anschließendem Waschen mit Wasser folgt der Antigendemaskierungsschritt, da bei Formalinfixierung und Paraffineinbettung die Immunreaktivität von Epitopen durch Proteinquervernetzung und Modifizierung gestört wurden. Die Antigendemaskierung stellt eine Methode der Renaturierung von Antigenen da, dabei wird die Immunreaktivität durch eine Kombination von enzymatischen Verdau in einer Retrieval-Lösung mit Dampfhitze wiederhergestellt. Dafür wurde eine 1x *Target Retrieval Solution* Arbeitslösung hergestellt und die deparaffinierten Schnitte für 20 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Nachdem der Puffer wieder abgekühlt und klar war, wurden die Schnitte gewaschen und für 4 min in 0,1% Triton X-100 / PBS Lösung zur Permeabilisierung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte mit einem Liquid-Blocker oder Pap Pen umrandet.

Anschließend folgte die eigentliche Immunfärbung. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte mit Roti® Immunoblock für 30 min geblockt. Danach wurden die Schnitte mit 100 µl Primärantikörperlösung (Primärantikörper in Blocklösung verdünnt) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Abgießen der Primärantikörperlösung und drei Waschschriften mit 1x PBS folgte die Inkubation mit 100 µl Sekundärantikörperlösung (Sekundärantikörper in Blocklösung) bei RT für 1 h im Dunkeln. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und gegen den primären Antikörper gerichtet. Die Wirtsspezies des Primärantikörpers ist ausschlaggebend für die Wahl des Sekundärantikörpers.

Die Sekundärantikörperlösung wurde nach der Inkubationszeit ebenfalls abgegossen und die Schnitte drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die Schritte der Primär- und Sekundärantikörperfärbung werden bei einer reinen Zellkernfärbung übersprungen.

Die Detektion der Zellkern erfolgt mittels DAPI-Färbung. Die Schnitte wurden für 3 – 5 min bei RT mit 100 µl einer 1 µg/µl DAPI-Färbelösung inkubiert, es folgte ein Waschgang mit 1x PBS. Abschließend wurden die Objektträger nach dem letzten Waschvorgang in destilliertes Wasser getaucht, getrocknet, mit *mounting medium* überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die Aufbewahrung der so haltbar gemachten Schnitte erfolgte möglichst lichtgeschützt, um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern. Die eingedeckelten und gefärbten Schnitte konnten dann mittels eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden.

2.2.4 Molekularbiologie

2.2.4.1 Retinaprobengewinnung

Die wie unter 2.2.2.1 beschrieben gewonnenen, unfixierten Augen wurden zur Retinaisolation wie unter 2.2.3.1 beschrieben geöffnet und die Retina herauspräpariert. Die Menge der isolierten Retina wurde ermittelt und die Retina ohne Flüssigkeit bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Für den molekularbiologischen Nachweis der mRNA einzelner Gene wurde zuerst die gesamte RNA aus den Gewebeproben isoliert. Hierfür wurde das „MasterPure Complete DNA + RNA Purification Kit“ verwendet. Sowohl die Isolierung der RNA als auch das Entfernen der Proteine beruht hierbei auf dem Prinzip der Ausfällung der jeweiligen Komponenten. Die Löslichkeit der Proteine wurde durch Zugabe von Salzen soweit eingeschränkt, dass diese ausfallen. RNA bzw. DNA wurde mit Alkohol ausgefällt.

Die bei -80°C gelagerten Retinaproben wurden auf Eis aufgetaut und mit 150 µl der im Kit enthaltenen *Tissue and Cell Lysis Solution* versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Ultraschall durch eine Sonotrode. Nach Sonifizierung der Proben wurden weitere 150 µl der Lyselösung, die mit 1 µl Proteinase K versetzt wurde, zugegeben und durch Vortexen gründlich gemischt. Der Proteinase-Verdau erfolgte im Heizblock bei 65°C für 15 min. Dabei wurde alle 5 min die Probe durch Vortexen gemischt. Der Verdau wurde 3-5 min auf Eis gestoppt. Anschließend wurden 150 µl *MPC Protein Precipitation Reagent* zugegeben und erneut gründlich gemischt. Die Salze, die in dieser Lösung enthalten waren, sorgten für das Ausfällen der Proteine. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet, welches die Proteine und andere Zellbestandteile enthielt, wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 500 µl kaltes Isopropanol zugefügt und 30-40-mal invertiert. Die aus dem Überstand ausfallende DNA und RNA wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 rpm für 10 min pelletiert. Das Isopropanol wurde entfernt und das Pellet in 200 µl DNase Solution, welche aus 195 µl DNase Puffer und 5 µl RNase freie DNase bestand, gelöst. Die Proben wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Um zu verhindern, dass bei einer späteren RT-PCR genomische DNA amplifiziert wird, wurde diese in diesem Schritt durch die RNase freie DNase verdaut.

Der DNase-Verdau wurde durch Zugabe von 200 µl *2x T und C Lysis Solution* und anschließendes Vortexen gestoppt. Durch die Zugabe von 200 µl *MPC Protein Precipitation Reagent* und 10 sec gründliches Mischen durch Vortexen wurde die verdaute DNA und alle

noch verbliebenen Proteine, wie z.B. Histone, ausgefällt. Die Probe wurde für 5 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein zweites Mal für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden eventuell noch enthaltene Proteine entfernt. Das Ausfällen der RNA geschah durch Zugabe von 500 µl kaltem Isopropanol, 30-40-maliges Invertieren und anschließende Pelletierung durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet wurde mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen. Nach dem vollständigen Verdampfen des Ethanols wurde das Pellet in 25 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.4.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgt durch die Messung der Absorption der Proben bei 260 nm. Durchgeführt wird die Messung mithilfe eines NanoDrop-Spektrometers. Dabei wird die optische Dichte (OD) der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$K [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V= Verdünnung

F= Faktor (40 für RNA, 50 für DNA)

Die Reinheit der RNA ist definiert durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm bzw. 280 nm. Das Verhältnis von E₂₆₀/280 liegt bei weitgehend proteinfreier RNA bei einem Wert von ca. 2,0. Davon abweichende Werte zeigen Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol an.

2.2.4.4 cDNA Synthese

Mithilfe der reversen Transkriptase wird ausgehend von der isolierten RNA ein cDNA-Strang synthetisiert. Die Verwendung eines Oligo (dT)₁₈ Primers gewährleistet die ausschließliche Synthetisierung der zellulären mRNA. Für die cDNA-Synthese wird das „ReverdAid First Strand cDNA-Synthese Kit“ von Fermentas verwendet.

Eingesetzt werden 1 µg der isolierten RNA. Das entsprechende Volumen wird mithilfe der am NanoDrop ermittelten RNA-Konzentration berechnet. Dieses wird mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 11 µl ergänzt. Für die Synthese werden anschließend folgende Komponenten zugegeben:

Reaktionspuffer 5x	4 µl
Oligo (dT) ₁₈ Primer (100 µM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 u/µl)	2 µl
RevertAid (200 u/µl)	1 µl

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes beträgt 20 µl. Durch kurzes Vortexen wird der Ansatz gemischt, entstandene Blasen werden durch kurzes Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge entfernt. Die Synthese findet in einem Thermocycler statt, der den Ansatz für 60 min auf 42 °C erwärmt, was der Optimaltemperatur der reversen Transkriptase entspricht. Anschließend erfolgt eine Hitzedeaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 5 min. Danach wird der Ansatz auf 4°C abgekühlt und kann bei -20 °C gelagert werden.

2.2.4.5 Quantitative *Real-time* Polymerase Kettenreaktion (Taqman®)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, die Expression bestimmter Zielgene in einem DNA-Konstrukt zu analysieren. Bei der *real-time* PCR erfolgt dies in Echtzeit mittels einer Fluoreszenz-Messung. Hierzu verwendet man genspezifische Oligonukleotidsequenzen (TaqMan-Sonden), die an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzreporterfarbstoff (VIC für GAPDH, FAM für alle anderen analysierten Gene) und an ihrem 3'-Ende mit einem Löscher (*Quencher*) verbunden sind. Solange sich der *Quencher* in direkter Nähe zum Reporterfarbstoff befindet, wird die Fluoreszenz unterdrückt. Sobald die hochspezifische Sonde an ihre entsprechende cDNA-Matrize bindet, wird die cDNA mithilfe von genspezifischen Primern durch die Taq-Polymerase amplifiziert und gleichzeitig wird die gebundene Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Durch diese Hydrolyse wird der *Quencher* vom Farbstoff getrennt und die Fluoreszenz kann gemessen werden. Dieses Signal steigt proportional zur Entstehung des PCR-Produktes an und wird nach jedem Zyklus erneut erfasst. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der 7500 Fast System SDS Software. Folgende Reaktionsansätze wurden pro Probe verwendet:

Tabelle 2 Taqman®- Reaktionsansatz pro Probe

	GAPDH	untersuchtes Gen
Genspezifische Sonde	0,3 µl (VIC markiert)	1 µl (FAM markiert)
LowRox PCR Mix	9 µl	9 µl
Wasser	8,7 µl	6 µl
DNA	1 µl	2 µl

Der Mastermix aus Sonde, LowRox und Wasser wurde sorgfältig gemischt und ohne DNA in einer 96-Well Platte vorgelegt. Für GAPDH werden jeweils 9 µl Mastermix und für das zu untersuchende Gen 8 µl Mastermix pro Well vorgelegt. Zur Doppelbestimmung wurden anschließend in je 2 Wells die gleiche DNA des zu untersuchenden Gens pipettiert. Der PCR-Lauf erfolgte in einem „7500 Fast Real-Time PCR System“ der Firma Applied Biosystems. Folgende qRT-PCR-Bedingungen wurden verwendet:

95°C 15 min	} 40 Zyklen
95 °C 15 sec	
60 °C 1 min	

Die relative Quantifizierung der erhaltenen Daten wurde anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt. Um die relative Expressionsregulation zu erhalten, wurde der C_T -Wert („*threshold cycle*“) des zu untersuchenden Gens mit dem C_T -Wert eines durch die verwendete Stimulation nicht regulierten Referenzgens verrechnet und dadurch normalisiert. Die Ermittlung der relativen Expressionsregulierung erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Relative Expression: } 2^{-(\Delta C_T - C\Delta C_T)}$$

ΔC_T : Differenz der C_T -Werte von reguliertem und Referenzgen

$S\Delta C_T - C\Delta C_T$: Differenz zwischen den regulierten Proben $\Delta C_T(S\Delta C_T)$ und der Kontrolle $\Delta C_T (C\Delta C_T)$

2.2.5 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die zur Analyse von Sphingolipide verwendete Liquid-Chromatographie mit anschließender Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurden durch das Institut für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Frankfurt durchgeführt und ausgewertet.

Zur quantitativen Bestimmung der Sphingosin- und S1P-Spiegel aus Plasma oder Retina wurde eine Lipidextraktion (Bligh and Dyer, 1959) durchgeführt. Dafür wurden die Proben mit 150 µl H₂O und den internen Standards Sphingosin-d7, Sphingosin-1-Phosphat-d7 and Sphingarin-d7 (500 ng/mL) vermischt und mit einer Schwingmühle (4 Zirkonoxidmahlkugeln pro Probe) bei 25 Hz für 2,5 min homogenisiert. Es folgten zwei Extraktionsschritte mit 600 µl Methanol:Chloroform:HCl (15:83:2, v/v/v). Die organische untere Phase wurde bei 45°C unter einem stetigen Fluß von Stickstoff evaporiert und in 50 µl Methanol wiederhergestellt. Die Analyse der Sphingolipidkonzentrationen erfolgte durch

Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie. Eine Luna C18 Säule wurde für die chromatographische Auftrennung verwendet. Die mobile HPLC Phase bestand aus Lösung A wässriger Methansäure (100:0,1, v/v) und Lösung B Acetonitril-Tetrahydrofuran-Methansäure (50:50:0,1, v/v/v). Für die Separation wurde ein Gradientenprogram mit Durchflußrate 0,3 ml/min verwendet. Der Initialpuffer bestand aus 60% der Lösung A und 40% der Lösung B, nach 36 sec wurde der Puffer linear über 3,9 min zu 0% Lösung A und 100% Lösung B verändert und 6,5 min angewendet. Anschließend wurde die Pufferzusammensetzung über 30 Sekunden linear zu 60% Lösung A und 40% Lösung B verändert und für weitere 4,5 Minuten angewendet. Es wurden 10 µl jeder Probe injiziert und die Gesamtlaufzeit betrug 16 Minuten. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 4000 ausgestattet mit einer ESI Ionenquelle durchgeführt. Datenverarbeitung wurde mit der Analyst Software V 1.6 und Datenauswertung mit der MultiQuant Software V 3.0 mit der internen Standardisierungsmethode für Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie, durchgeführt. Linearität der Kalibrierungskurve für Sphingosin und Sphinganol lag bei 0,02 bis 5 ng/mg Gewebe und für Sphingosin-1-Phosphat und Sphinganol-1-Phosphat bei 0,1 bis 10 ng/mg Gewebe. Der Korrelationskoeffizient lag bei mindestens 0,99.

2.2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism durchgeführt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mittels *Student t*-Test für unverbundene Stichproben auf statistische Signifikanz überprüft. Bei Vergleichen zwischen mehr als zwei Gruppen wurde die "One way-Analyse der Varianz" (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur angewendet. Daten wurden als Mittelwert (*mean*) ± Standardabweichung (SD) angezeigt. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Sphingosinkinasen in der Retina

Das Gleichgewicht zwischen den proapoptotischen Sphingolipiden Ceramid (Cer) und Sphingosin (Sph) auf der einen Seite und dem proliferativen Sphingosin-1-Posphat (S1P) auf der anderen spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von zellulären Prozessen und wird durch verschiedene Enzyme aufrechterhalten. Die beiden Sphingosinkinasen (Sphk1 und Sphk2), die durch Phosphorylierung S1P bilden, sind dabei von besonderem Interesse (siehe Kap. 1.4.5). In den letzten Jahren beschrieben einige Veröffentlichungen eine zentrale Rolle von S1P bei retinalen Erkrankungen mit Neovaskularisationen (NV) (Xie et al., 2009), und des S1P/S1PR1 Signalweges in der physiologischen retinalen Angiogenese (Gaengel et al., 2012). Über die Funktion der beiden Sphks in physiologischer und pathologischer Angiogenese ist bislang jedoch wenig bekannt. Aus diesem Grund untersuchten wir zuerst das Vorkommen der Sphks und ihre Rolle in der retinalen Angiogenese.

3.1.1 Retinales Vorkommen beider Sphk Isoformen

Zur Untersuchung der Expressionsniveaus beider Isoformen der Sphk in der Retina wurden unbehandelte WT Augen entnommen, ihre Retina extrahiert und diese mittels semiquantitativer *real-time* PCR auf ihre murine Sphk1- und Sphk2-Expression untersucht. Beide Isoformen konnten in der Mausretina nachgewiesen werden, die Expression der Sphk2 war dabei signifikant höher als die der Sphk1, exemplarisch ist hier der Auswertungstag P14 gezeigt (Abb. 24). Auf Basis dieser Daten wurden die weiteren Versuche mit Mäusen durchgeführt, bei denen die Sphk2-Expression global moduliert wurde.

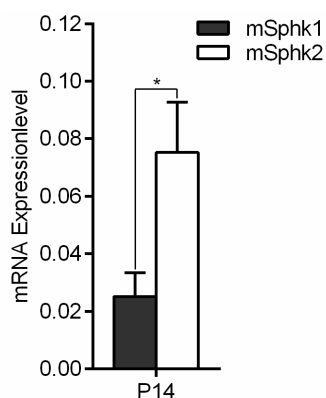


Abb. 24 Expression der beiden Isoformen der Sphk in der Mausretina.

Gezeigt ist die Expression der murinen Sphk1 und murinen Sphk2 in der Retina von WT an P14 die mittels qRT-PCR quantifiziert und auf GAPDH normalisiert wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD; $n=5$; $*p<0,05$. (Modifiziert aus Eresch et al. (2018)).

3.1.2 Modulation der Sphk2 in den gentechnisch veränderten Mauslinien

Da zuvor die Sphk2 als die prominentere der beiden Isoformen in der Retina ermittelt wurde, was sich mit Beobachtungen im ZNS-Gewebe deckt (Blondeau et al., 2007), wurde deren Rolle in der vaskulären Entwicklung der Retina näher betrachtet. Dafür wurden 2 genetisch veränderte Mauslinien verwendet, die Sphk2 *knockout* (Sphk2^{-/-}) (siehe 2.2.1.2) und die Sphk2 überexprimierende (tgSphk2) Maus, bei der durch einen *knockin* des humanen Sphk2 (hSphk2) Gens eine Überexpression, basierend auf der globalen andauernden Expression des zusätzlichen humanen Sphk2 Gens ohne Expressionregulierung, erzielt wurde (siehe 2.2.1.3). Beide Mauslinien wurden auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt, wodurch diese als WT Kontrollen dienten.

Zur Kontrolle des *knockins* wurden Retinae von tgSphk2 Mäusen mittels qRT-PCR auf ihre mRNA Expression der murinen Sphk2 (mSphk2) und der humanen Sphk2 (hSphk2) untersucht. Die Expression beider Sphk2 Gene konnte in der Retina der tgSphk2 Mäuse nachgewiesen werden. Die Expression der hSphk2 war an allen untersuchten Entwicklungstagen auf einem höheren Level als die der mSphk2 (Abb. 25 A). Weiterhin wurde der *knockout* in der Sphk2^{-/-} Retina durch eine mSphk2 mRNA Expressionsstudie mittels qRT-PCR untersucht. In den Sphk2^{-/-} Mäuse konnte erwartungsgemäß keine mSphk2-Expression nachgewiesen werden, während die mSphk2-Expression der WT über die untersuchten Entwicklungstage weitestgehend stabil blieb (Abb. 25 B).

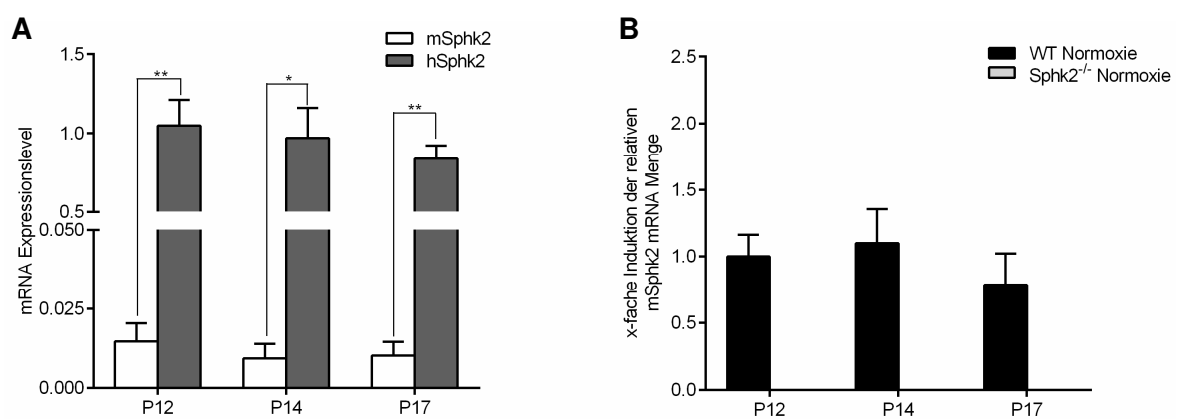


Abb. 25 Kontrolle des humanen Sphk2 Gen-knockins in der tgSphk2 Maus und des mSphk2 Gen-knockouts in der Sphk2^{-/-} Maus. (A) Expression der humanen und murinen Sphk2 in der Retina von Mäusen mit einem *knockin* des humanen Sphk2 Gens. P12, P14 und P17 Retinae von tgSphk2 Mäusen wurden extrahiert und die mRNA Expression der murinen Sphk2 (mSphk2) und der eingeschriebenen humanen Sphk2 (hSphk2) mittels qRT-PCR quantifiziert und auf GAPDH normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=3. (Modifiziert aus Eresch et al. (2018)) (B) Expression der murinen Sphk2 in der Retina von WT und Sphk2^{-/-} Mäusen. P12, P14 und P17 Retinae von Sphk2^{-/-} Mäusen wurden extrahiert und die mRNA Expression der murinen Sphk2 mittels qRT-PCR quantifiziert, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=4/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01.

3.1.3 Expression der Sphks in den genetisch veränderten Mäusen

Da beide Modulationen in der Netzhaut nachgewiesen werden konnten, wurden im nächsten Schritt beide Isoformen der Sphks in den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen untersucht. Komplementäre Regulierungsvorgänge zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion sind keine Seltenheit bei gentechnisch veränderten Mauslinien. In den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurde jeweils nur die Sphk2 in ihrer Expression moduliert, die Expression der anderen Isoform unterliegt weiterhin der normalen zellulären Kontrolle.

In den Sphk2^{-/-} Mäusen konnten bereits komplementäre Regulierungsvorgänge der Sphk1 in Mesangiumzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Schwalm et al., 2015). Die Überexpression der humanen Sphk2 im tgSphk2 Modell kann zu komplementären Regulierungen nicht nur der Sphk1 führen, sondern auch zu Veränderungen der murinen Sphk2.

Um diese möglichen komplementären Regulierungen zu untersuchen wurden Retinae von tgSphk und Sphk2^{-/-} Mäusen mittels qRT-PCR auf ihre mSphk1- und mSphk2-Expression an den Entwicklungstagen P12, P14 und P17 untersucht.

Dabei zeigte sich eine tendenziell geringere Expression beider muriner Isoformen in den tgSphk2 Mäusen (Abb. 26 A+B). Die Sphk2^{-/-} Mäuse weisen, wie schon gezeigt, keine Sphk2-Expression auf. Die Sphk1-Expression erscheint dagegen vor allem am ersten Auswertungstag tendenziell eher leicht erhöht im Vergleich zu den Wildtypen, ohne dass die genannten Unterschiede statistische Signifikanz erreichten (Abb. 26 A).

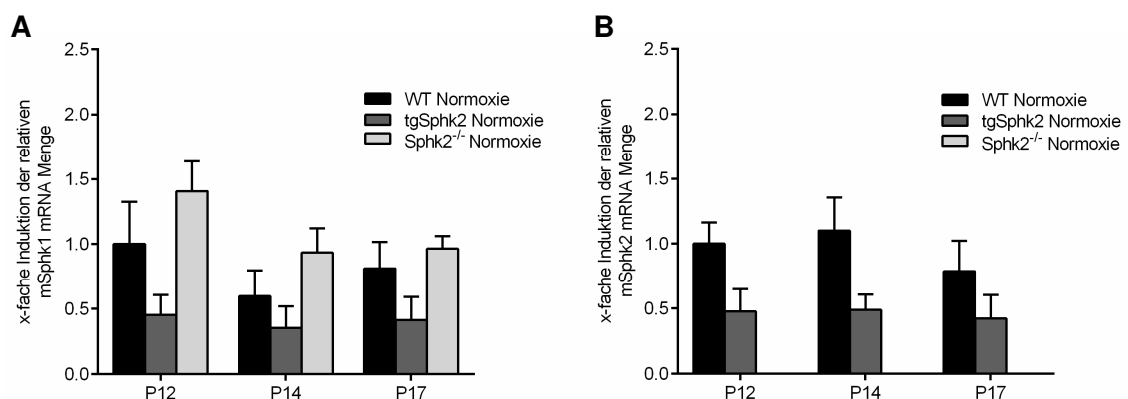


Abb. 26 Expression der mSphk1 und der mSphk2 in WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Retinae. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an den Auswertungstagen P12, P14 und P17 isoliert und mittels qRT-PCR auf ihre mRNA Expression von mSphk1 (**A**) und mSphk2 (**B**) untersucht, auf GAPDH normiert und als Vielfaches von WT P12 dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=4/Gruppe.

3.1.4 Einfluss der Sphk2 Modulation auf die Angiogenese

Die physiologische Gefäßentwicklung in der Mausretina vollzieht sich in den ersten zwei postnatalen Wochen. An etwa P7/P8 ist die Entwicklung des primären superfiziellen Gefäßplexus abgeschlossen, das Aussprossen in die Retina zur Bildung des intermediären und tiefen Plexus beginnt (siehe Kap. 1.2.1). Zu diesem Zeitpunkt kann die Anzahl der Gefäßverzweigung als Anhaltspunkt für die Gefäßdichte, und damit für Veränderungen im Gefäßbett und der vaskulären Entwicklung, mit der *branching point* Analyse ermittelt werden (siehe Kap. 2.2.3.2.1). Zu diesem Zweck wurden von allen drei Mauslinien WT, Sphk2^{-/-} und tgSphk2 an P7 Retinaflachpräparate erstellt und die Gefäße mittels TRITC-Lectinfärbung sichtbar gemacht.

In der Inspektion der Flachpräparate war noch kein deutlicher Unterschied in der retinalen Vaskularisierung zu erkennen. Alle Retinae wiesen ein dichtes Gefäßbett aus, welches bis zur Peripherie ausgewachsen war (Abb. 27 A). Erst die Analyse der *branching points* zeigte einen Unterschied zwischen den einzelnen Mauslinien. Dabei wiesen die tgSphk2 Mäusen die höchste Anzahl an *branching points* und die Sphk2^{-/-} die geringste auf (Abb. 27 B).

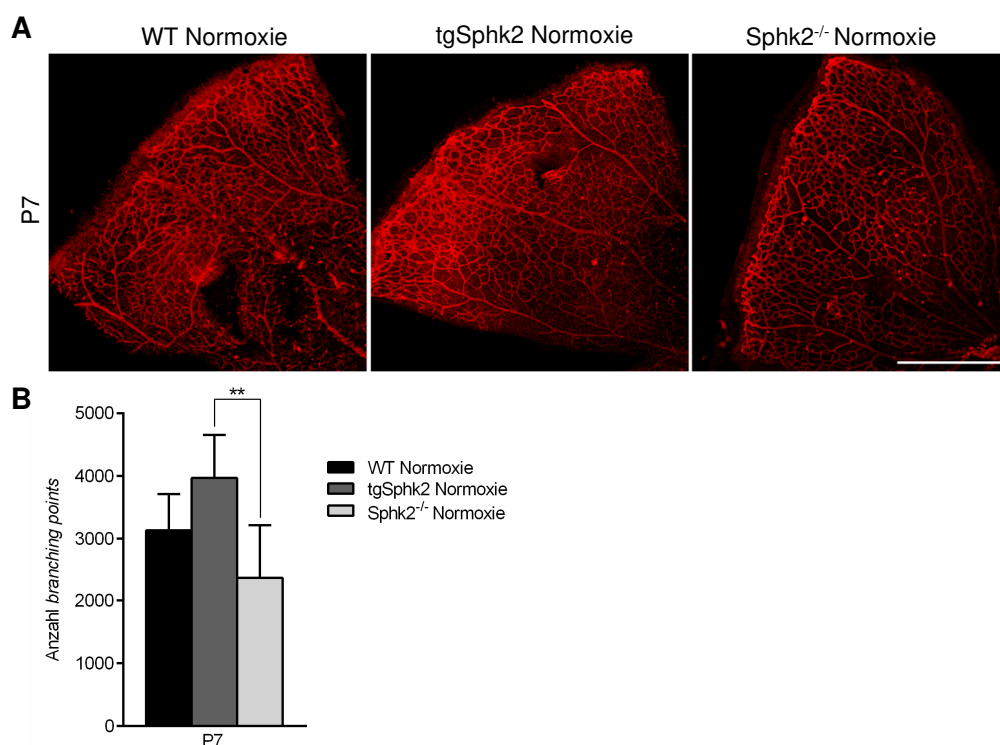


Abb. 27 Sphk2 Modulation in der retinalen Gefäßentwicklung. (A) Ausschnitt retinales Flachpräparat mit TRITC gekoppelten Lectin auf Endothelzellen gefärbt von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen an P7. Maßstab 500 μ m. **(B)** *Branching point*-Analyse der Lectin gefärbten Retinae unter Normoxiebedingungen an P7 von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD; n=12; **p<0,01; Maßstab 500 μ m. (Modifiziert aus Eresch et al. (2018)).

3.1.5 Einfluss der Sphk2 Modulation auf die retinale Schichtdicke

Die Retina weist nach Abschluss ihrer Entwicklung ein aufwendiges neurales Netzwerk auf, aufgeteilt in drei nukleäre und zwei plexiforme Schichten. Einer der letzten Schritte in der Retinogenese ist die Kondensierung der Schichten, und die Schichtdicke der ONL und INL kann damit Rückschlüsse auf den Entwicklungsstand der Retina liefern (Heavner and Pevny, 2012). Veränderungen in der Vaskularisierung können sich auf die retinale Morphologie auswirken, von der die Funktion der Retina abhängig ist. Untersuchungen der retinalen Schichten mittels einer DAPI-Zellkernfärbung können bereits einen Aufschluss auf Morphologie und damit Funktionalität der Retina geben.

Dafür wurden ganze Augen von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen an P12, P14 und P17 in Paraffin eingebettet und 3 µm Dünnschnitte aus dem Bereich um den Sehnerv herum angefertigt (siehe Kap. 2.2.3.3 und 2.2.3.4). Diese wurden dann mit DAPI auf ihre Zellkerne angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie begutachtet. Dabei fielen die deutlich kompaktere und dichtere Struktur der ONL und INL sowohl in tgSphk2 als auch in Sphk2^{-/-} Mäusen an P12 auf. Im Gegensatz zur den WT Retinae bei denen die ONL und INL in ihrer Dicke und Dichte an Zellkernen sich verändert, gibt es keine deutlichen Unterschiede zwischen P12, P14 und P17 in den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen (Abb. 28 A).

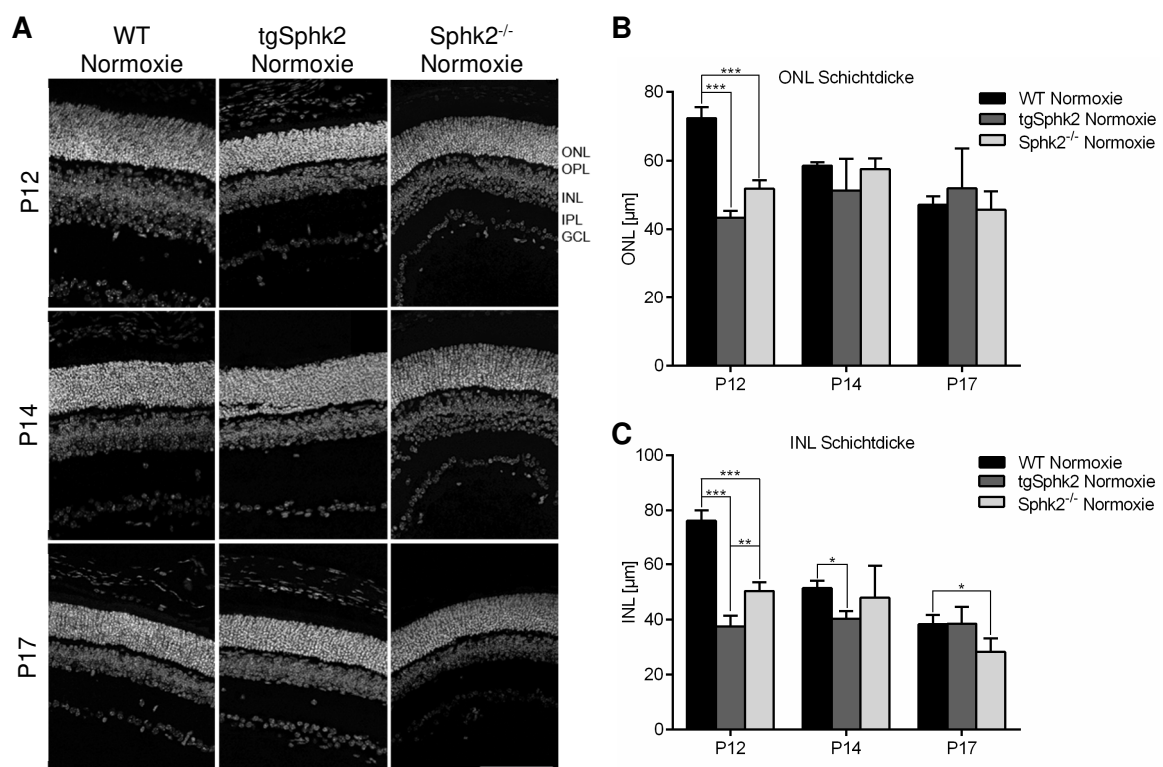


Abb. 28 Sphk2 Modulation in der retinalen Schichtbildung. (A) Zellkernfärbung von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Retina Paraffinschnitte mit DAPI. Maßstab 100µm. (B) Messung der Schichtdicke der äußeren nukleären Schicht (ONL, *outer nuclear layer*) unter Normoxiebedingungen. (C) Messung der Schichtdicke der inneren nukleären Schicht (INL, *inner nuclear layer*) unter Normoxiebedingungen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD; n=5; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Dies konnte durch die Analyse der Schichtdicke in μm mittels ImageJ bestätigt werden. Die ONL beider genetisch veränderten Mauslinien ist deutlich verringert in ihrer Dicke an P12. Während die ONL der WT Mäuse über die Zeit an Dicke abnimmt, ist dies bei den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen nicht zu erkennen. Bis P17 nähert sie die ONL in allen drei Mauslinien einem ähnlichen Level an (Abb. 28 B). Die INL der Sphk2^{-/-} Mäuse ist signifikant dicker als die der tgSphk2, beide sind jedoch deutlich dünner als die der WT. Und nur in den Sphk2^{-/-} Mäuse ist eine Abnahme in der INL Dicke über die Zeit zu erkennen, diese ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den WT (Abb. 28 C).

3.1.6 Einfluss der Sphk2 Modulation auf Sphingolipide in Retina und Plasma

Sphk2 katalysiert die enzymatische Produktion von S1P aus Sphingosin und reguliert damit das Sphingolipid-Rheostat. Für die Sphk2^{-/-} Mäuse wurden bereits veränderte zelluläre Konzentrationen von Sphingosin und S1P in Mesangiumzellen und embryonischen Fibroblasten beschrieben (Hofmann et al., 2008; Schwalm et al., 2015). Zur Untersuchung ob dies auch in der Retina zutrifft wurden die Konzentrationen von S1P, Sph, dhS1P und Sphinganin (Dihydrosphingosin) in der Retina von WT, tgSphk2 Mäusen und Sphk2^{-/-} Mäusen mittels LC-MS/MS bestimmt.

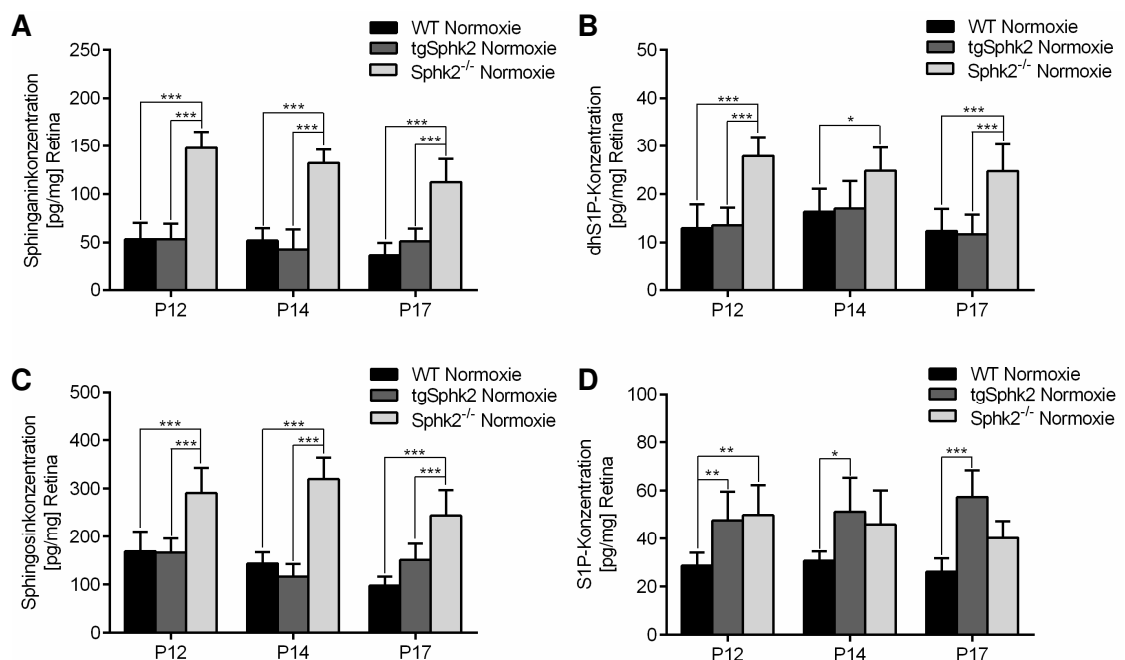


Abb. 29 Sphingolipidkonzentrationen in der Retina von WT und Sphk2 modulierten Mäusen. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 isoliert und mittels LC-MS/MS Methode auf Sphingolipidkonzentrationen untersucht. **(A)** Retinale Sphinganinkonzentration. **(B)** Retinale dhS1P-Konzentration. **(C)** Retinale Sph-Konzentration. **(D)** Retinale S1P-Konzentration. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=8/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Über alle drei Entwicklungsstadien blieben die retinalen Sphingolipidlevel in den jeweiligen Mauslinien weitestgehend stabil. Betrachtete man die Konzentrationsbereiche wurde deutlich, dass Sph und Sphingalin in höherer Konzentration im retinalen Gewebe vorlagen als S1P und dhS1P. Die tgSphk2 waren erwartungsgemäß durch signifikant um ca. 30-50 % erhöhte S1P-Spiegel im Vergleich zum WT charakterisiert (Abb. 29 D), während Sph, Sphingalin und dhS1P keine signifikanten Unterschiede zeigten (Abb. 29 A-C). Bei den Sphk2^{-/-} wurden zunächst kontraintuitiv ebenfalls leicht erhöhte S1P-Level im WT-Vergleich festgestellt, signifikant war dieser Unterschied jedoch nur an P12 (Abb. 29 D). Es wurden jedoch deutlich höhere Konzentration von Sph, Sphingalin und dhS1P in diesen Mäusen gemessen (Abb. 29 A-C).

Zur weiteren Charakterisierung wurden auch Plasmaproben der drei Mauslinien mittels LC-MS/MS untersucht. Hierbei zeigte sich im Plasma der tgSphk2 Mäuse deutlich verringerte Sphingalin- und dhS1P-Level, wohingegen die Sphingosin und S1P Konzentrationen im Bereich der WT Mäuse lagen (Abb. 30 A-D). In den Sphk2^{-/-} Mäusen wies Sphingalin dagegen höhere Plasmakonzentration im Vergleich mit den WT auf, während die Plasmakonzentration von dhS1P dagegen deutlich verringert war (Abb. 30 A+B). Die Spiegel von Sphingosin und S1P waren im Vergleich zu den WT Mäusen, erneut kontraintuitiv, deutlich erhöht (Abb. 30 C+D).

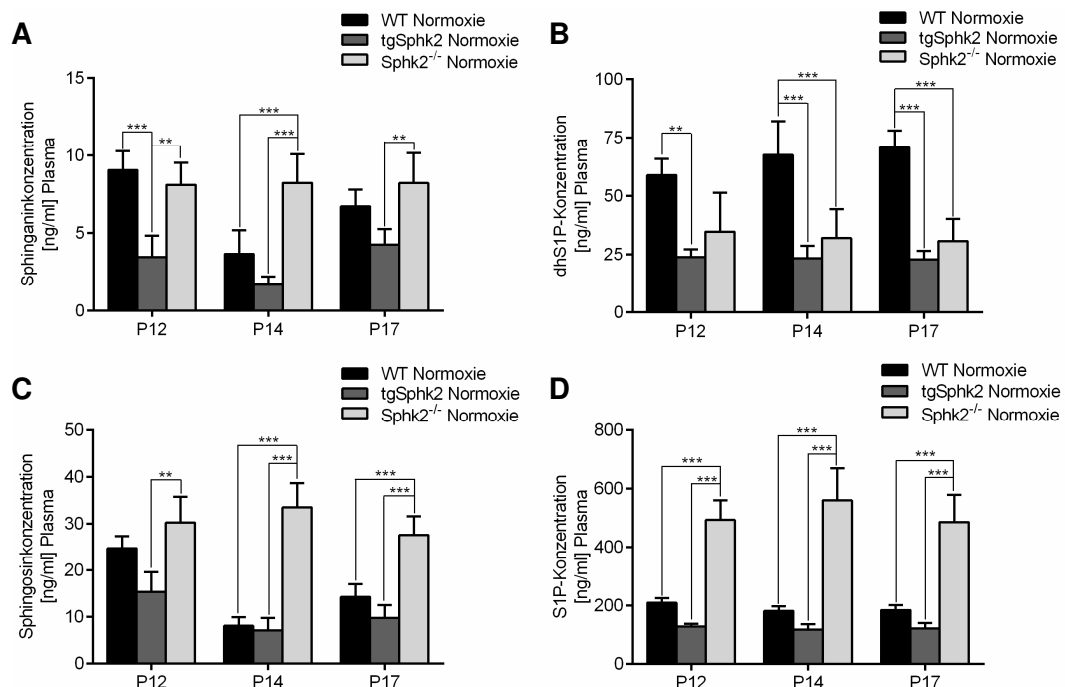


Abb. 30 Sphingolipidkonzentrationen im Plasma von WT und Sphk2 modulierten Mäusen. Plasma von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 wurde mittels LC-MS/MS Methode auf Sphingolipidkonzentrationen untersucht. (A) Plasma Sphingalin-Konzentration. (B) Plasma dhS1P-Konzentration. (C) Plasma Sph-Konzentration. (D) Plasma S1P-Konzentration. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=4/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Betrachtete man die Konzentrationsbereiche, so wurde deutlich, dass im Gegensatz zum retinalen Gewebe, mit wie für das interstitielle Kompartiment beschrieben niedrigem S1P-Spiegeln, im Plasma deutlich höhere S1P Konzentrationen vorlagen.

3.1.7 Einfluss der Sphk2 Modulation auf die Expression der S1P-Rezeptoren

S1P vermittelt wichtige biologischen Funktionen über seine 5 G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), wobei autokrine und parakrine Signalkaskaden aktiviert werden. Je nach Rezeptorexpression im jeweiligen Gewebe werden verschiedenste biologische Vorgänge reguliert, darunter Gefäßstabilität und Integrität (S1PR1, S1PR3), endotheliale Schrankenstörungen und vaskulärer Schaden (S1PR2) und Immunantwort (S1PR4). (Blaho and Hla, 2014).

Inwieweit eine Modulation der Sphk2, und der daraus resultierenden Veränderung der S1P Konzentration im retinalen Gewebe schon während der Entwicklung die Expression der S1P-Rezeptoren beeinflusst, wurde im weiteren Verlauf untersucht. Dafür wurden Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen an P12, P14 und P17 isoliert und mittels qRT-PCR auf ihre S1PR1 – S1PR5 mRNA Expression untersucht. In der sich entwickelnden Retina konnte die Expression von S1PR1, S1PR2, S1PR3 und S1PR4 nachgewiesen werden.

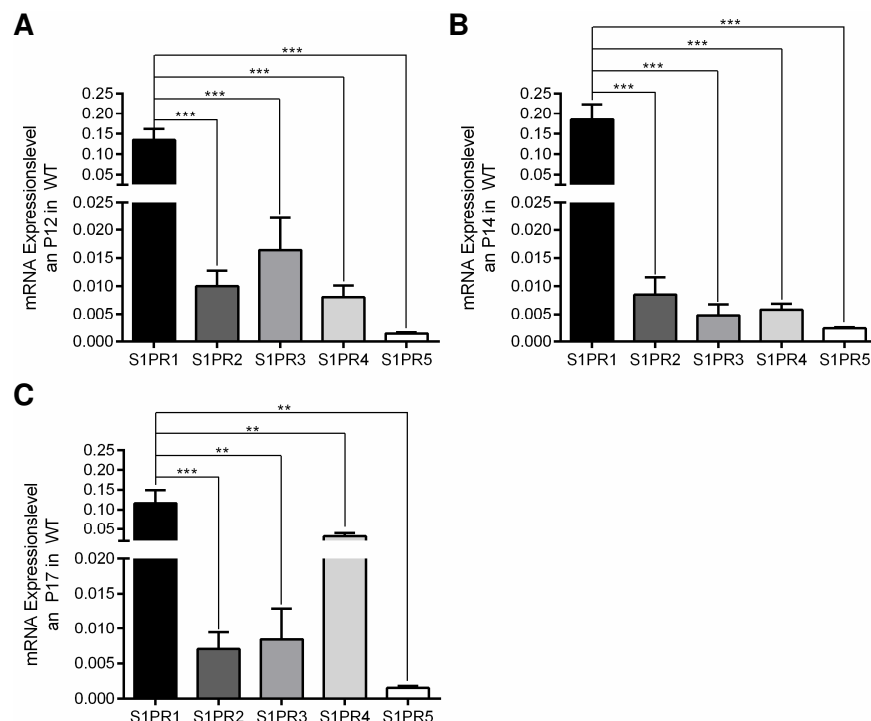


Abb. 31 Expression der fünf membranständigen G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptoren während der retinalen Entwicklung. Retinae von WT wurden an P12 (A), P14 (B) und P17 (C) mittels qRT-PCR auf ihre S1P-Rezeptor mRNA Expression untersucht und auf GAPDH normiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Dabei ist S1PR1 an allen Entwicklungstagen deutlich stärker exprimiert als die anderen S1P-Rezeptoren, während die Expression von S1PR2 stabil ist. S1PR3 sinkt zunächst von P12 auf P14 und steigt dann wieder etwas an. Die Expression von S1PR4 nimmt an P17, zum Ende der Entwicklung, deutlich zu und befindet sich zu dem Zeitpunkt in einer ähnlichen Größenordnung wie S1PR1. S1PR5 war an allen drei Auswertungstagen kaum detektierbar (Abb. 31 A-C).

Auf Basis dieses S1PR Expressionsmusters wurde entschieden, im weiteren Verlauf die retinale Expression von S1PR1–S1PR4 in den genetisch veränderten Mäusen zu untersuchen. Es wurden Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen an P12, P14 und P17 isoliert und mittels qRT-PCR auf ihre Rezeptorexpression untersucht. In den WT wurde ein Anstieg bei S1PR1 an P14 mit einem anschließenden Abfall an P17 festgestellt. S1PR2 wies ein stabiles Expressionslevel auf, während S1PR3 eine zu S1PR1 gegenläufige Expression zeigte, mit einem Minimum an P14 und einem folgenden leichten Anstieg an P17. Ein 8-facher Anstieg im Lauf der retinalen Gefäßentwicklung bis zu P17 konnte bei S1PR4 festgestellt werden (Abb. 32 A-D). Eine deutliche Verringerung der retinalen S1PR1-Expression konnte sowohl in den tgSphk2 als auch in den Sphk2^{-/-} Mäusen an den ersten beiden Auswertungstagen gezeigt werden. Bis zu P17 stieg S1PR1 während der physiologischen Gefäßentwicklung in tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen jedoch auf WT Niveau an (Abb. 32 A).

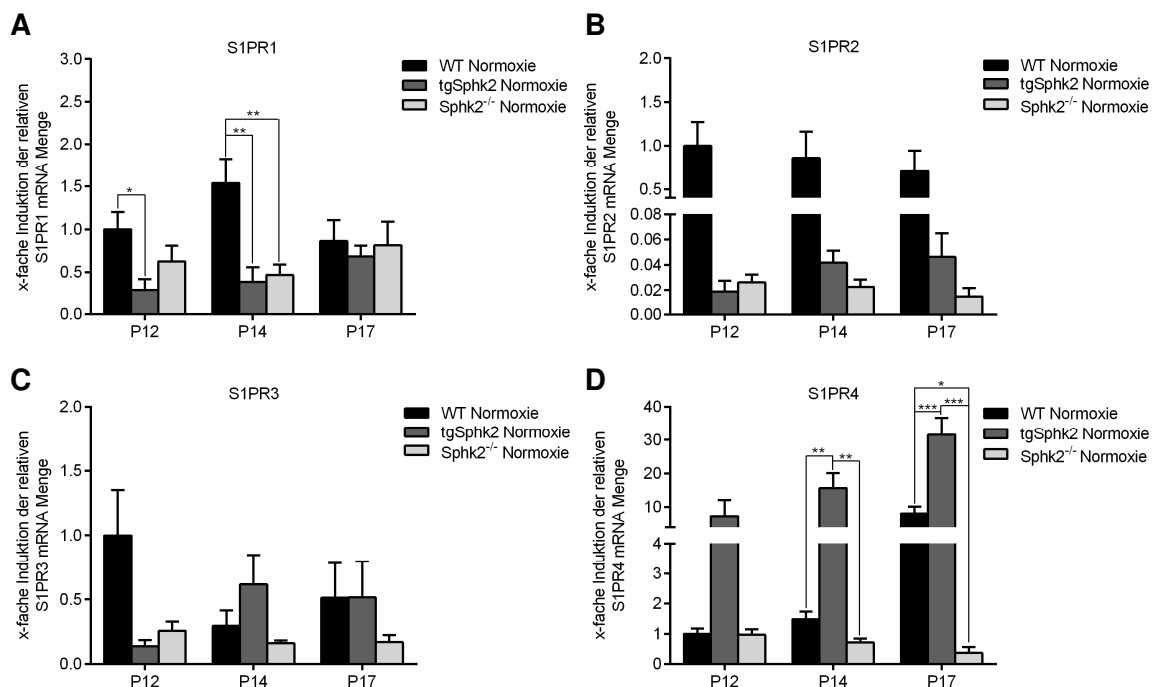


Abb. 32 Retinale Expression der S1P-Rezeptoren in WT und Sphk2 modulierten Mäusen. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 mittels qRT-PCR auf ihre S1P-Rezeptor mRNA Expression untersucht, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 dargestellt. (A) Retinale S1PR1-Expression. (B) Retinale S1PR2-Expression. (C) Retinale S1PR3-Expression. (D) Retinale S1PR4-Expression. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Die retinale S1PR2-Expression war in beiden Mauslinien an allen drei Auswertungstagen stark verringert im Vergleich zu WT (Abb. 32 B). Bei den tgSphk2 stieg die S1PR3-Expression zunächst an und blieb dann auf diesem Level, während sie in Sphk2^{-/-} Mäusen an allen drei Auswertungstagen auf einem niedrigen Expressionslevel blieb (Abb. 32 C). Das Expressionsniveau von S1PR4 war signifikant erhöht in den tgSphk2 Mäusen. An P17, wo auch eine deutliche Expressionssteigerung in den WT zu beobachten war, stieg S1PR4 nochmal auf das ca. 4-fache des WT Expressionsniveaus an, während in den Sphk2^{-/-} Mäusen S1PR4 auf einem konstant niedrigen Niveau blieb (Abb. 32 D).

3.1.8 Einfluss der Sphk2 Modulation auf vaskuläre Wachstumsfaktoren

Die biologischen Effekte von S1P überschneiden sich bidirektional mit den Effekten einer großen Anzahl von vaskulären Wachstumsfaktoren. Dies ist teilweise durch eine direkte Transaktivierung von S1P Signalkaskaden durch diese Faktoren und umgekehrt bedingt (Lebman and Spiegel, 2008). Einer dieser Faktoren mit besonderer pathophysiologischer Bedeutung bei gefäßproliferativen Netzhauterkrankungen ist VEGF, welcher über seinen Rezeptor VEGFR-2 Blutgefäßwachstum stimuliert (Carmeliet and Jain, 2011) (siehe 1.3.1). Für S1P mit seinen beschriebenen pro-angiogenen aber auch sprossungshemmenden und gefäßstabilisierenden Funktionen (Gaengel et al., 2012) konnte bereits eine Aktivierung von VEGFR-2 bei VEGF Abwesenheit durch das Lipid demonstriert werden (Endo et al., 2002; Tanimoto et al., 2002).

Inwieweit eine Sphk2 Modulation und die daraus resultierende Veränderung der S1P-Spiegel schon während Retinogenese und Angiogenese die Expression von Wachstumsfaktoren beeinflussen, wurden im weiteren Verlauf in WT und den Mauslinien mit genetischer Modifikation der Sphk2 untersucht. Dafür wurden Retinae an P12, P14 und P17 isoliert und mittels qRT-PCR auf ihre VEGF α -Expression untersucht.

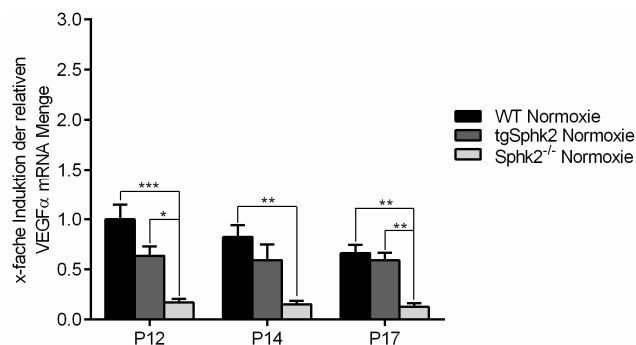


Abb. 33 VEGF α -Expression in der Retina von WT und Sphk2 modulierten Mäusen. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 mittels qRT-PCR auf ihre VEGF α mRNA Expression untersucht, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Sowohl in den tgSphk2 als auch bei den Sphk2^{-/-} Mäusen zeigte sich eine Verringerung der VEGF α -Expression im Vergleich zu den WT Mäusen, wo die VEGF-Spiegel im Lauf der physiologischen Entwicklung des Gefäßnetzes langsam abnahmen. Die VEGF-Spiegel in der Retina von tgSphk2 Mäusen unterschieden sich nicht signifikant vom WT. Es zeigte sich in diesen Mäusen, die eine dichteres Gefäßnetz aufwiesen, eine Tendenz zu niedrigen VEGF-Spiegeln, die sich im Verlauf der physiologischen Gefäßentwicklung jedoch komplett anglich. Die Sphk2^{-/-} Retinae dagegen wiesen eine signifikant reduzierte VEGF α -Expression auf (Abb. 33).

Neben VEGF α sind Angpt1 und Angpt2 mit ihrem Tyrosinekinase-Rezeptor Tie2 wichtige vaskulären Wachstumsfaktoren. Der Angpt1/Tie2 Signalweg unterstützt die Erhaltung von Gefäßstabilität, -reifung und -integrität (Campochiaro, 2015), während Angpt2 als Tie2-Antagonist und Angpt1 Konkurrent agiert und damit zur Gefäßdestabilisierung beiträgt (Hackett et al., 2002). So wurden ergänzend zu den VEGF α Expressionsdaten auch die mRNA Expression von Angpt1 und Angpt2 in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} an P12, P14 und P17 mittels qRT-PCR untersucht.

Hierbei zeigte sich in der WT Retina ein mehr als 1,5-facher Anstieg der Angpt1-Expression an P14, der bis P17 stabil blieb (Abb. 34 A), während Angpt2 von P12 und P14 auf P17 in seiner Expression abnahm (Abb. 34 B). Die tgSphk2 Mäuse verhielten sich in ihrer Angpt-Expression relativ ähnlich wie die WT Mäuse, sowohl in Bezug auf Angpt1 (Abb. 34 A), als auch auf Angpt2 (Abb. 34 B). Die Sphk2^{-/-} Mäuse zeigten eine deutlich reduzierte Angpt-Expression sowohl von Angpt 1 (Abb. 34 A) als auch Angpt2 (Abb. 34 B) als die WT Mäuse.

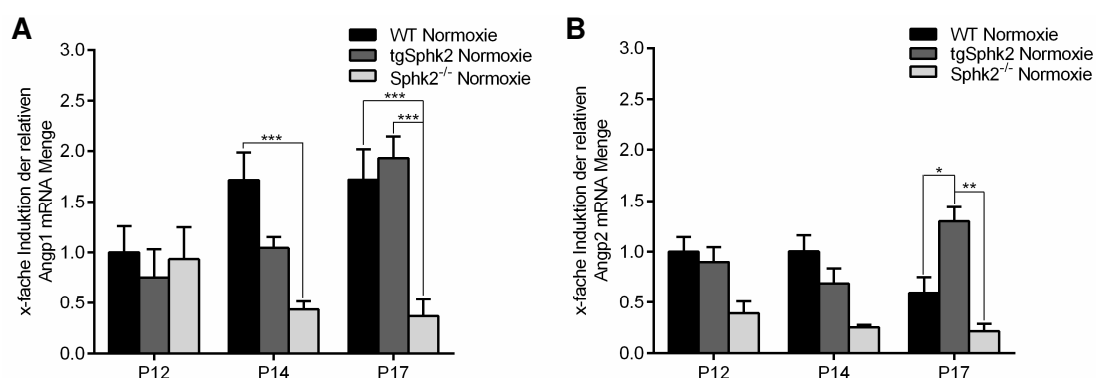


Abb. 34 Angpt1- und Angpt2-Expression in der Retina von WT und Sphk2 modulierten Mäusen. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 mittels qRT-PCR auf ihre Angpt1 (A) und Angpt2 (B) mRNA Expression untersucht, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

3.2 Modulation der Sphingosinkinase 2 im OIR Modell

Pathologisches Gefäßwachstum ist eine der Hauptursachen für Visusverlust, die vielen ischämischen Retinopathien gemein ist. Retinale Hypoxie, verursacht durch Gefäßverschlüsse oder Durchblutungsstörungen in Retinopathien stimuliert die Produktion angiogener Faktoren. Als Folge wird physiologisches und pathologisches Gefäßwachstum induziert. Die Neovaskularisierung (NV) erfolgt zumeist wuchernd, Gefäße können in den Glaskörper einwandern und Gefäßbündel und -büschel (*cluster* und *tufts*) auf der Retina bilden, die wiederum zu Blutungen führen können. Des Weiteren bilden sich fibrovaskuläre Stränge aus. Netzhautablösungen sind die Folge.

Die Beteiligung von S1P und dessen Rezeptoren an physiologischer Angiogenese und retinaler NV wurden bereits beschrieben (Gaengel et al., 2012; Skoura et al., 2007; Xie et al., 2009), jedoch sind die genauen Mechanismen noch unklar. Ebenso wie die Rolle der Sphk2 in pathologischer Angiogenese. Zur Untersuchung welchen Einfluss die Modulation von Sphk2 auf die retinale NV hat, wurde das OIR Mausmodell auf die bereits zuvor beschrieben tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mauslinien im Vergleich zum WT angewendet, welches die zwei Phasen der ROP simuliert (siehe 1.2.2 und 2.2.2).

3.2.1 Einfluss der Sphk2 Modulation auf Vaso-Obliteration und Neovaskularisierung

Um die retinale Gefäßentwicklung im Verlauf des OIR Modells analysieren zu können, wurden Flachpräparate von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Retinae an den Auswertungstagen P12, P14 und P17 angefertigt und diese mit TRITC gekoppeltem Lectin gefärbt, um die Gefäße sichtbar zu machen.

Die hohe Sauerstoffkonzentration in der hyperoxischen Phase von P7 bis P12 führte zu Gefäßverlust im zentralen Teil der Retina, diese Vaso-Obliteration (VO) und damit die entstehende avaskuläre Zone erreichte ihr Maximum an P12 (Abb. 35 WT OIR). Danach begann die hypoxische Phase des Modells. Nach Rückkehr zur Raumluft, stellte die nun niedrigere Sauerstoffkonzentration eine relative Hypoxie dar, was zur Ausschüttung Sauerstoff-regulierter vaskulärer Wachstumsfaktoren führt um NV und Revaskularisierung zu induzieren (Stahl et al., 2010). Erstes Auswachsen von Gefäßen war ab P14 erkennbar und hatte sein Maximum an P17 (Abb. 35 WT OIR).

Durch die Lectin gefärbten *flatmounts* konnten erste Aussagen über den Gefäßverlust, das Gefäßwachstum und den Zustand des Gefäßsystems getroffen werden. Vergleicht man an P12 die avaskuläre Zone der Sphk2 modulierten Retinae untereinander und mit denen der WT, zeigte sich kein sichtbarer Unterschied zwischen WT und Sphk2^{-/-}, jedoch eine deutlich kleinere avaskuläre Zone bei tgSphk2 von P12 an (Abb. 35 P12). An P14 ist im Vergleich

zwischen den WT und den tgSphk2 Mäusen, die avaskuläre Zone bei tgSphk2 weiterhin deutlich kleiner und das Gefäßsystem wirkt dichter, zudem waren ausgeprägte *cluster* und *tufts* sichtbar (Pfeile). Bei Sphk2^{-/-} schien die avaskuläre Zone im Gegensatz zur beginnenden Revaskularisation in WT, an P14 nicht kleiner geworden zu sein, das Gefäßsystem erschien jedoch dichter und ungeordneter (Abb. 35 P14). An P17 zeigten sich die deutlichsten Unterschiede im Gefäßsystem. Bei den WT war die avaskuläre Zone deutlich kleiner geworden, *cluster* und *tufts* (Pfeile), starke NV-Zonen (Pfeilköpfe) und Einblutungen (kurze offene Pfeile) waren erkennbar.

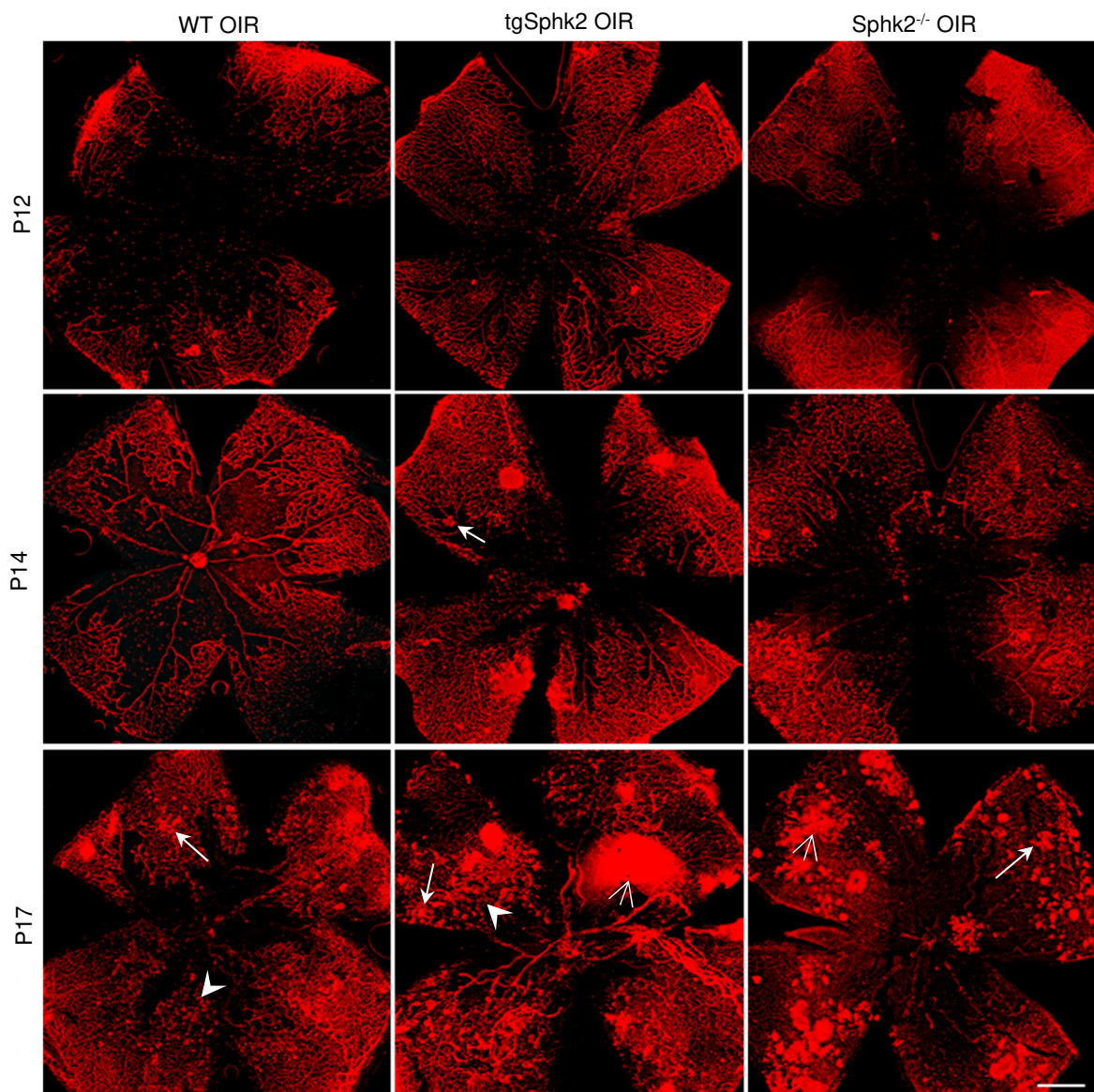


Abb. 35 Sphk2 Modulation im OIR Modell beeinflusst Gefäßverlust und NV. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 des Modells entnommen und die Gefäßentwicklung mittels TRTC-Lectinfärbung von *flatmounts* untersucht. P12 stellt der Zustand des maximalen Gefäßverlustes der hyperoxischen Phase des Modells dar, P14 ist der Beginn der hypoxischen Phase und der Gefäßwucherung, P17 ist der Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der NV. Pfeile = *cluster* und *tufts*; Pfeilköpfe = NV-Zonen; kurze offene Pfeile = Einblutungen. Maßstab 500 µm. (Modifiziert aus Eresch et al. (2018)).

Das Gefäßsystem erschien dichter und ungeordneter. Bei den tgSphk2 Mäusen war kaum noch eine zusammenhängende avaskuläre Zone vorhanden. Einige Blutungszonen, *clusters*, *tufts* und NV-Zonen waren erkennbar. Das Gefäßsystem erschien sehr chaotisch. Bei den Sphk2^{-/-} Retinae waren kaum normal ausgebildete Gefäße sichtbar, dafür jedoch viele Blutungszonen, und *clusters* und *tufts* (Abb. 35 P17).

Diese Beobachtungen können mittels zweier Analyseverfahren evaluiert werden. Einmal die vaskuläre Obliteration (VO) mittels der blutgefäßfreien zentralen Zone an P12, P14 und P17 (siehe Kap. 2.2.3.2.2) und weiterhin auf die NV an P14 und P17 (siehe Kap 2.2.3.2.3). Bei den tgSphk2 Mäusen zeigte sich eine signifikant kleinere avaskuläre Zone (28,3%) von Beginn an, die kontinuierlich abnahm (P12 auf P14: 11,1%; P14 auf P17: 8,9%) und bis P17 auf 8,3% der Gesamtfläche reduziert war. Die Sphk2^{-/-} Mäuse wiesen eine ähnliche avaskuläre Zone wie die WT an P12 auf (WT: 43,3%; Sphk2^{-/-}: 42,0%), jedoch war diese an P17 prozentual noch am größten (WT: 19,2%; Sphk2^{-/-}: 24,7%; Abb. 36 A). Sie zeigten ein initial langsames Wachstum (P12 auf P14: 3,9%; P14 auf P17: 13,4%), ähnlich der WT (P12 auf P14: 4,9%; P14 auf P17: 19,2%). Damit zeigte sich eine Gesamtreduktion der avaskulären Zone bei den WT von 24,1%, bei den tgSphk2 von 20% und bei den Sphk2^{-/-} von 17,3%.

Die NV-Daten komplementierten die Ergebnisse der VO-Analyse. Von P14 an zeigten die tgSphk2 Mäuse bereits eine signifikant erhöhte NV auf (2,8%), mit den höchsten Werten an P17 (8,0%) im Vergleich zu den WT (P14: 1,3%; P17: 6,5%). Die Sphk2^{-/-} Mäuse wiesen signifikant verringerte NV-Werte an beiden Auswertungstagen auf, mit 0,43% an P14 und 3,9% an P17 (Abb. 36 B).

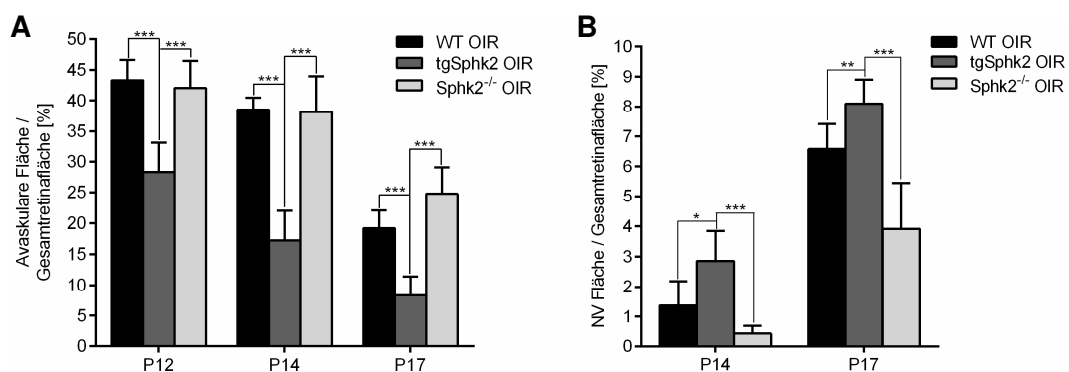


Abb. 36 Analyse von VO und NV im OIR Modell. (A) VO-Analyse von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Retinae an P12, P14 und P17 im OIR Modell anhand von Lectin gefärbten Retina *Flatmounts*. Die zentrale avaskuläre Zone wird in Prozent zur Retinagesamtfläche dargestellt. (B) Analyse der NV von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Retinae an P14 und P17 im OIR Modell anhand von Lectin gefärbten Retina *Flatmounts*. Die NV wurde erst ab P14 gemessen, da im OIR Modell erst ab diesem Tag Gefäßwachstum induziert und messbar wird. Die NV Fläche wird in Prozent zur Retinagesamtfläche dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=12/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. (Modifiziert nach Eresch et al. (2018)).

3.2.2 Einfluss des OIR Modells auf die Expression der Sphingosinkinasen

Um den möglichen Einfluss von Hyperoxie und Hypoxie auf die Expression der Sphk festzustellen, wurden die im Kapitel 3.1.3 bereits unter Normoxiebedingungen untersuchten WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäuse dem OIR Modell ausgesetzt. Die Retinae dieser Mäuse wurden dann an den Entwicklungstagen P12, P14 und P17 entnommen und mittels qRT-PCR auf ihre mSphk1 und mSphk2 mRNA Expression untersucht.

Dabei zeigte sich eine leicht erhöhte Expression der mSphk1 in WT an P14 im OIR Modell. In den Retinae der tgSphk2 Mäusen konnte eine erhöhte Expression der mSphk1 vor allem an P12 und P17 des Modells festgestellt werden. In den Sphk2^{-/-} Mäusen zeigte sich eine verringerte Expression der mSphk1 an allen drei Auswertungstagen unter OIR Bedingungen (Abb. 37 A).

Die mSphk2-Expression im OIR Modell war in den WT ab P14 reduziert. In den tgSphk2 Mäusen war die bereits unter Normoxiebedingungen verringerte mSphk2-Expression ab P14 im Modell weiter vermindert. Die Sphk2^{-/-} Retinae wiesen auch unter OIR Bedingungen wie erwartet keine mSphk2-Expression auf (Abb. 37 B).

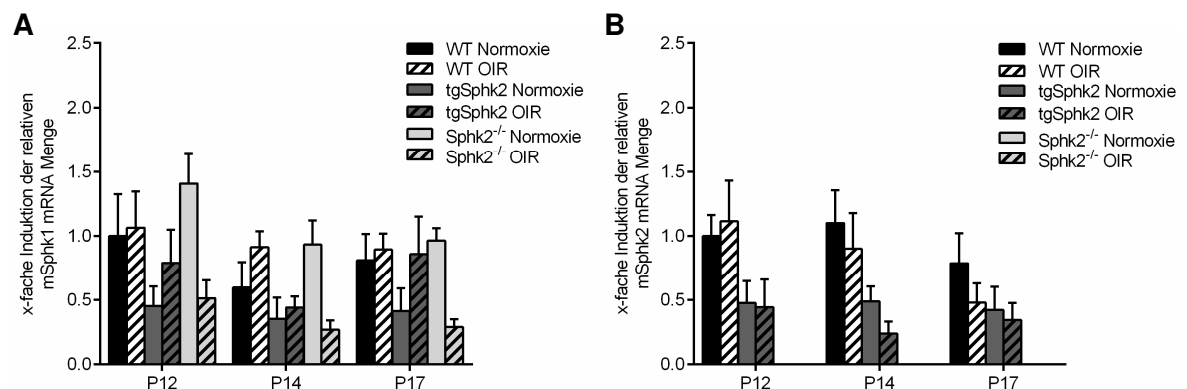


Abb. 37 mRNA Expression von mSphk1 und mSphk2 in WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an den Auswertungstagen P12, P14 und P17 des OIR Modells isoliert und mittels qRT-PCR auf ihre mRNA Expression von mSphk1 (**A**) und mSphk2 (**B**) untersucht, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 Normoxie dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=4/Gruppe.

3.2.3 Sphingolipide im OIR Modell

3.2.3.1 Sphingolipide in der Retina von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses des OIR Modells auf den Sphingolipidmetabolismus, wurden retinale und plasmatische Sphingolipidkonzentrationen von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen, die dem OIR Modell unterzogen wurden, mittels LC-MS/MS Methode bestimmt.

Allgemein hatte das OIR Modell eher geringe Einflüsse auf die retinalen Sphingolipidlevel ohne signifikante Unterschiede in den verschiedenen Genotypen über die gesamte Beobachtungsphase des Krankheitsmodells. In den WT Mäusen waren nur Sphingosin und Sphinganine an P17 signifikant erhöht (um ca. 30 – 50 %) im Vergleich mit ihren unbehandelten Kontrollen. In den tgSphk2 Mäusen zeigte sich nur bei Sphinganine an P12 eine deutliche Reduktion (Abb. 38 A), während weder dhS1P (Abb. 38 B), noch Sph (Abb. 38 C) und S1P (Abb. 38 D) durch das OIR Modell beeinflusst waren. In den Sphk2^{-/-} Mäusen zeigte sich isoliert an P12 eine signifikante Reduktion der retinalen S1P-Level um ca. 20 % im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrollen (Abb. 38 D), aber auch hier hatte das OIR Modell keinen weiteren Einfluss auf die retinalen Konzentrationen von Sphinganine (Abb. 38 A), dhS1P (Abb. 38 B) und Sph (Abb. 38 C).

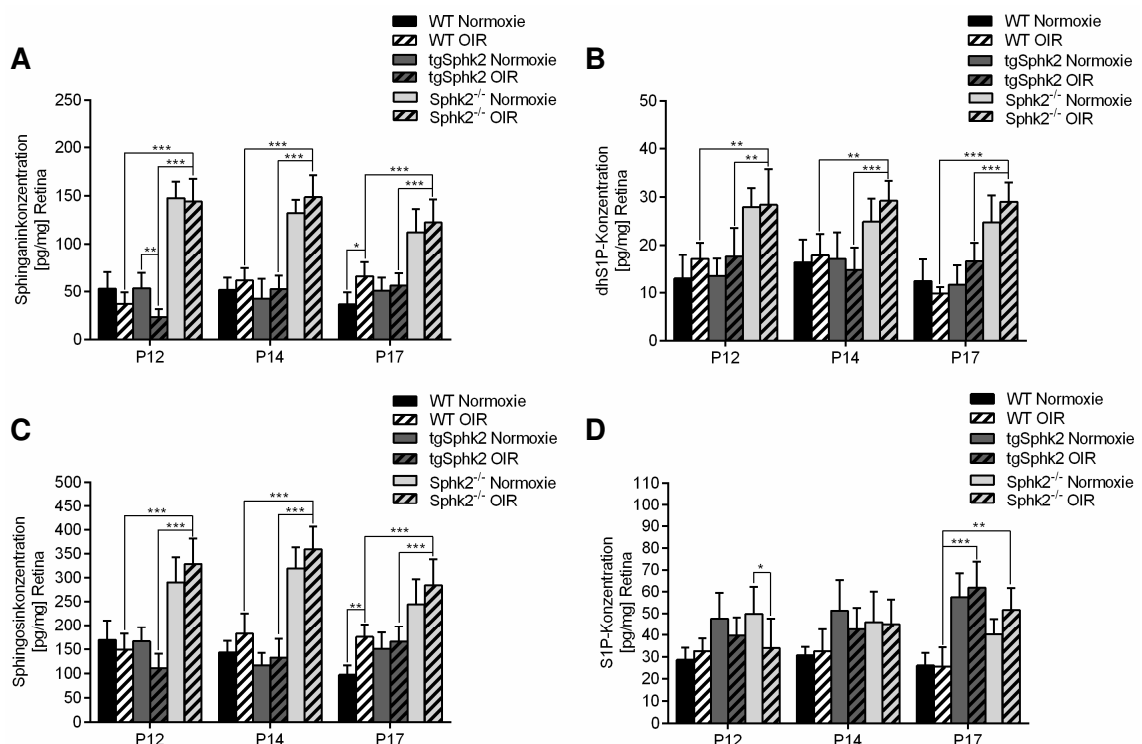


Abb. 38 Sphingolipidkonzentrationen in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 isoliert und mittels LC-MS/MS Methode auf Sphingolipidkonzentrationen untersucht. (A) Retinale Sphinganinekonzentration. (B) Retinale dhS1P-Konzentration. (C) Retinale Sph-Konzentration. (D) Retinale S1P-Konzentration. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=8/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. (Modifiziert nach Eresch et al. (2018))

3.2.3.2 Sphingolipide im Plasma von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen

Auch auf die Sphingolipidkonzentrationen im Plasma hatte das OIR Modell wenig Einfluss. So waren die Plasmakonzentrationen von Sphinganine wie schon unter Normoxiebedingungen (siehe 3.1.5) im Vergleich zu den WT in den tgSphk2 Mäusen deutlich verringert, jedoch zeigten weder WT noch tgSphk2 Mäuse eine Veränderung darüber hinaus. Nur in den Sphk2^{-/-} Mäusen führte das OIR Modell an P14 zu einem signifikanten Anstieg der Sphinganinekonzentration im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrollen (Abb. 39 A).

Die Plasmakonzentrationen von dhS1P dagegen zeigten einen signifikanten Anstieg an P12 und P14 des Modells in den WT Mäusen, während in den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen ein allgemein niedriges dhS1P-Level nachweisbar war, unabhängig vom OIR Modell (Abb. 39 B). Sph ist im Plasma der WT an P14 des OIR Modells, dem Start der NV, signifikant erhöht, während in den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäuse keine Veränderungen ihrer Sph-Konzentrationen im Modell im Vergleich zu ihren Normoxiekontrollen nachweisbar waren (Abb. 39 C). Insbesondere auf die S1P-Konzentration in WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen hatte das OIR Modell keinerlei Einfluss (Abb. 39 D).

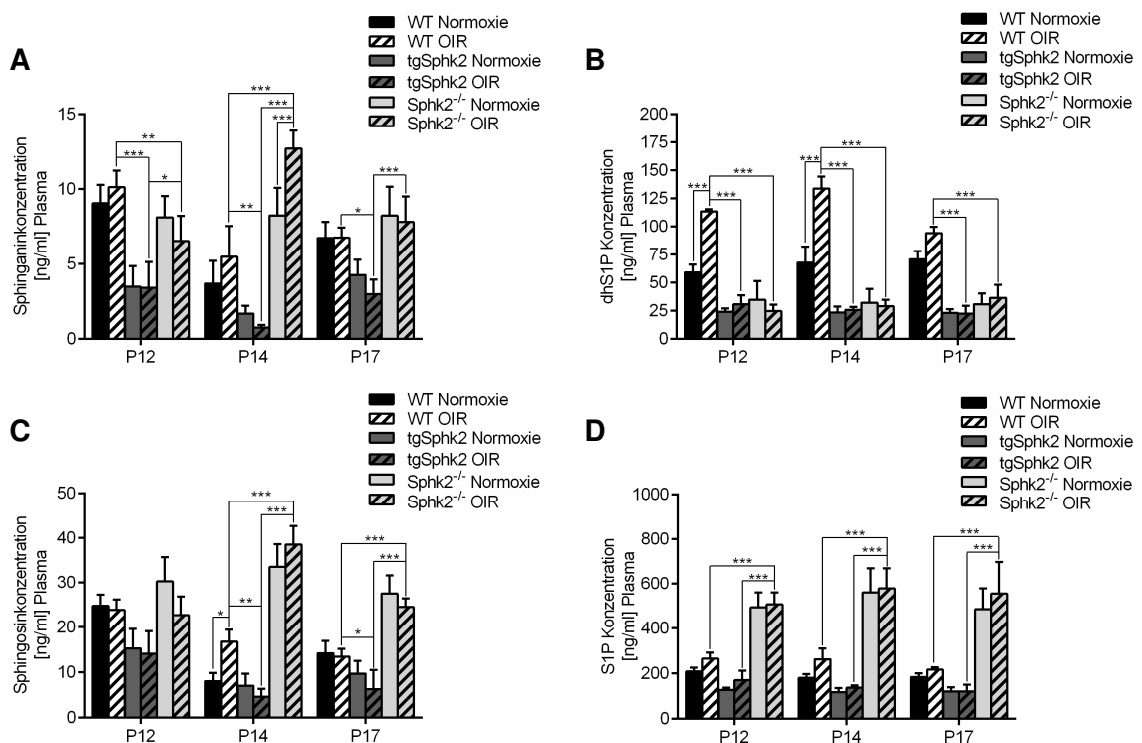


Abb. 39 Sphingolipidkonzentrationen im Plasma von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen. Plasma von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 mittels LC-MS/MS Methode auf Sphingolipidkonzentrationen untersucht. (A) Sphinganinekonzentration im Plasma. (B) dhS1P-Konzentration im Plasma. (C) Sph-Konzentration im Plasma. (D) S1P-Konzentration im Plasma. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=4/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3.2.4 Retinale S1P-Rezeptorexpression in tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen

S1P vermittelt wie bereits beschrieben seine Signaltransduktion vor allem über seine Rezeptoren. Bereits in Kapitel 3.1.7 wurde gezeigt, dass die Modulation der Sphk2 einen Einfluss auf die Rezeptorexpression hat, mit einer verringerten Expression von S1PR1 und S1PR2 bei gesteigerter Expression von S1PR4 in den tgSphk2 Mäusen und einer verminderten Expression aller S1P-Rezeptoren in den Sphk2^{-/-} Mäusen. Im Weiteren wurde die retinale Expression der S1P-Rezeptoren 1 bis 4 unter Einfluss von Hyperoxie und Hypoxie in WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen an den Entwicklungstagen P12, P14 und P17 mittels qRT-PCR untersucht.

Dabei zeigte sich eine tendenziell verringerte Expression des S1PR1-Rezeptors in den WT an P12 und P14 im Modell. Diese Herunterregulierung durch das Modell konnte nicht in den tgSphk2 Mäusen beobachtet werden, jedoch in den Sphk2^{-/-} Mäusen. An P17 waren keine deutlichen Unterschiede in der S1PR1-Expression zu erkennen, und auch das Modell hatte keinen weiteren Einfluss. (Abb. 40 A). Die S1PR2-Expression war in den WT an P12 und P14 OIR Modell signifikant erhöht. Diese Hochregulierung war weder in den tgSphk2 noch in den Sphk2^{-/-} Mäusen zu beobachten.

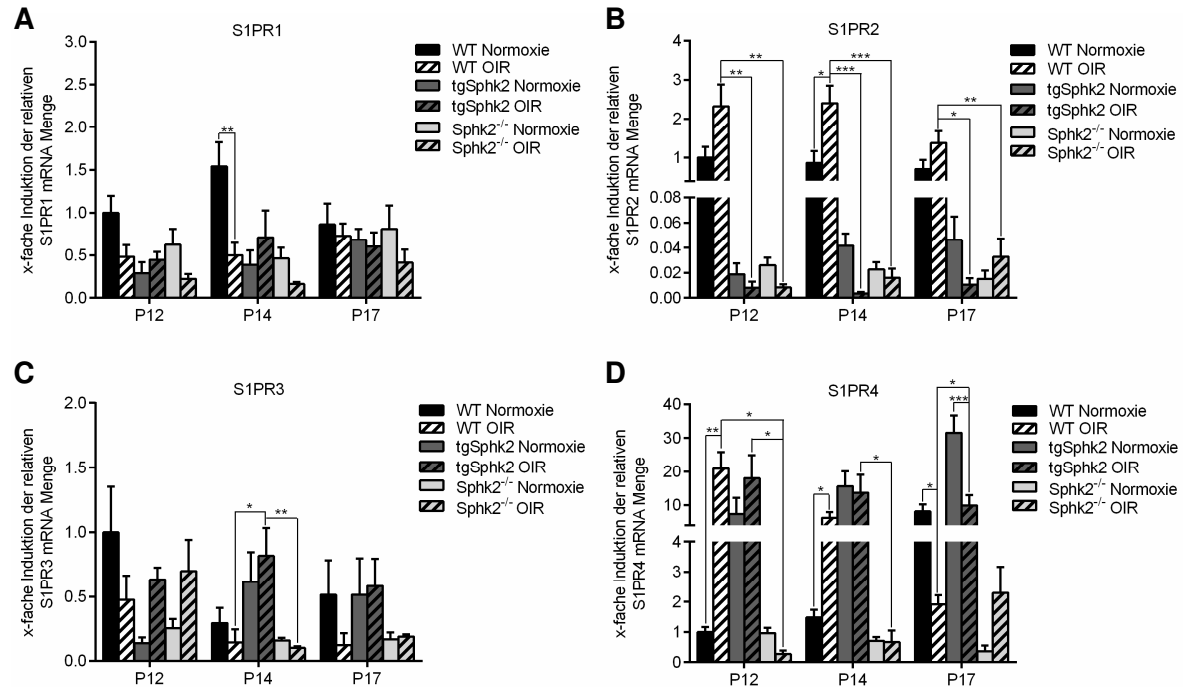


Abb. 40 Expression der S1P-Rezeptoren in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen im OIR Modell. Retinae von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 des OIR Modells isoliert und mittels qRT-PCR auf S1PR-Expression untersucht. (A) Retinale S1PR1-Expression. (B) Retinale S1PR2-Expression. (C) Retinale S1PR3-Expression. (D) Retinale S1PR4-Expression. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. (Modifiziert nach Eresch et al. (2018))

Insgesamt war die S1PR2-Expression an allen drei Entwicklungstagen in den tgSphk2 Mäusen auf einem konstant niedrigen Level, während sie in den Sphk2^{-/-} Mäusen an P17 einen tendenziellen Anstieg zeigte (Abb. 40 B).

Die Expression des S1PR3 zeigte weder an P12 noch an P17 eine deutliche Veränderung in allen drei Mauslinien. Eine signifikant höhere S1PR3-Expression konnte nur an P14 in den tgSphk2 beobachtet werden, während in den Sphk2^{-/-} die Rezeptorexpression im OIR Modell deutlich verringert war.

Der S1PR4-Rezeptor zeigte die deutlichste Regulierung in seiner Expression durch das OIR Modell. In den WT konnte an P12 ein 20-facher Anstieg der S1PR4-Expression beobachtet werden, welcher sich über die Entwicklungsphase verringerte. An P14 war die S1PR4-Expression noch erhöht, an P17 war die Expression signifikant verringert.

In den tgSphk2 Mäusen konnte nur an P12 ein leichter Anstieg der S1PR4-Expression beobachtet werden. Während die Expression an P14 im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrollen keine Veränderung aufzeigte, konnte an P17 jedoch eine starke Herunterregulierung der Rezeptorexpression auf etwa ein Viertel der unbehandelten Kontrolle ermittelt werden. In den Sphk2^{-/-} Mäusen war die S1PR4-Expression an P12 und P14 auf einem sehr geringen Level, stieg jedoch im OIR Modell zu P17 an (Abb. 40 D).

3.2.5 Vaskuläre Wachstumsfaktoren im OIR Modell

In Kapitel 3.1.8 wurde der Einfluss der Sphk2 Modulation auf die vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF α , Angpt1 und Angpt2 während der Angiogenese unter Normoxiebedingungen beschrieben. Zusammengefasst verhielten sich VEGF, Angpt 1 und Angpt2 in den tgSphk2 Mäusen relativ ähnlich wie in den WT Mäusen mit einem langsamen Abfall der an P12 am höchsten VEGF-Spiegel im Lauf der Entwicklung während in den Sphk2^{-/-} Mäusen über den gesamten Zeitraum nur sehr niedrige VEGF- und Angpt-Spiegel zu beobachten waren. Um nun den Einfluss der Sphk2 Modulation auf vaskuläre Wachstumsfaktoren unter Hyperoxie und Hypoxie zu untersuchen, wurden retinale mRNA Expressionstudien mittels qPCR auf VEGF α , Angpt1 und Angpt2 von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäuse im OIR Modell vorgenommen.

3.2.5.1 Einfluss der Sphk2 Modulation auf VEGF

Wie bereits beschrieben, ist VEGF einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren zur Stimulation von Blutgefäßwachstum sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen und vermittelt seine Signaltransduktion unter anderem über VEGFR-2, welcher bei VEGF Abwesenheit von S1P aktiviert werden kann (Carmeliet and Jain, 2011; Endo et al., 2002; Tanimoto et al., 2002).

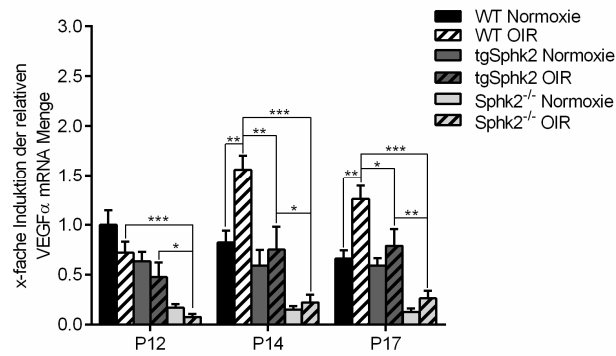


Abb. 41 VEGF-Expression in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen im OIR Modell. Retinae von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 des OIR Modells mittels qRT-PCR auf ihre VEGFα mRNA Expression untersucht, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001. (Modifiziert nach Eresch et al. (2018))

Zu Beginn, in der Hyperoxiephase, ist in den WT eine tendenziell verringerte Expression von VEGFα zu beobachten, dies zeigt sich ebenfalls in den tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen, wobei diese jedoch bereits unter Normoxiebedingungen eine verringerte Expression zeigten. Unter OIR ist diese eher noch weiter reduziert (Abb. 41 P12).

Zu Beginn der Hypoxiephase, nach Rückkehr in die Raumluft an P14, ist in den WT Mäusen ein deutlicher Anstieg der VEGFα-Expression um 70 % im Vergleich mit den Retinae unter Normoxiebedingungen zu beobachten. Diese Hochregulierung ist in den WT auch noch an P17, dem Zeitpunkt des NV Maximus, vorhanden (Abb. 41).

Auch in den tgSphk2 als auch in den Sphk2^{-/-} ist eine Tendenz zur Hochregulierung von VEGFα ab P14 erkennbar im Vergleich zu ihren jeweiligen Normoxiekontrollen. Die Retinae der tgSphk2 Mäuse, die von Beginn der Beobachtung an eine dichteres Blutgefäßwachstum aufwiesen, zeigten an P14 und an P17 eine jeweils etwas geringere VEGF-Expression unter Normoxiebedingungen im Vergleich zu den Retinae der WT und keine signifikante Hochregulation im OIR Modell (Abb. 41 tgSphk2).

In den Sphk2^{-/-} Mäusen war an allen drei Entwicklungstagen im Vergleich zu den WT spontan und unter OIR ein frappierend reduzierte VEGF-Expression, mit nur sehr verzögertem Anstieg am letzten OIR Beobachtungstag zu beobachten (Abb. 41).

3.2.5.2 Einfluss der Sphk2 Modulation auf den Angpt/Tie2 Signalweg

Der Angpt/Tie2 Signalweg spielt neben dem VEGF Signalweg ebenfalls eine wichtige Rolle im Wachstum und der Erhaltung des Blutgefäßsystems. Die Signaltransduktion von Angpt1/Tie2 trägt hierbei zur Gefäßstabilisierung und Integrität bei und hemmt retinale und choroidale NV, während Angpt2 als Tie2-Agonist agiert und damit zur Gefäßdestabilisierung beiträgt (Campochiaro, 2015; Hackett et al., 2002). Die Angpt2-

Expression steigt in der ischämischen Retina an. Bei Anwesenheit von VEGF kooperieren die beiden Wachstumsfaktoren, um NV zu fördern. In Abwesenheit von VEGF stimuliert Angpt2 die Regression der NV und Reduzierung des Kapillarnetzes (Oshima et al., 2005).

In den Retinae der WT Mäuse ist die Expression von Angpt1 an allen drei Beobachtungstagen im OIR Modell verringert, wobei die deutlichste Reduktion an P17 vorliegt. In den Retinae der tgSphk2 Mäusen ist zu Beginn des Modells in der Hyperoxiephase an P12 die Angpt1-Expression signifikant erhöht im Vergleich zu den WT OIR Retinae. Über den weiteren Verlauf des Modells sank die Expression jedoch auf ein ähnlich niedriges Level wie in den WT Mäusen. In den Sphk2^{-/-} Mäusen war an allen drei Entwicklungstagen im OIR Modell die Expression von Angpt1 auf einem stark reduzierten Level (Abb. 42 A).

Die Angpt2-Expression in den WT Retinae zeigte zu Beginn des Modells an P12 eine tendenzielle Reduktion, bis P17 kehrte sich diese Tendenz um und die Expression war leicht erhöht. In den tgSphk2 Mäusen war an P12 eine frühe signifikant höhere Angpt2-Expression messbar, welche auch noch an P14 vorhanden war. An P17 sank die Expression von Angpt2 in den Retinae der tgSphk2 Mäusen signifikant ab. In den Retinae der Sphk2^{-/-} Mäuse war die Angpt2-Expression an P12 und P14 im OIR deutlich verringert, an P17 stieg sie deutlich an (Abb. 42 B).

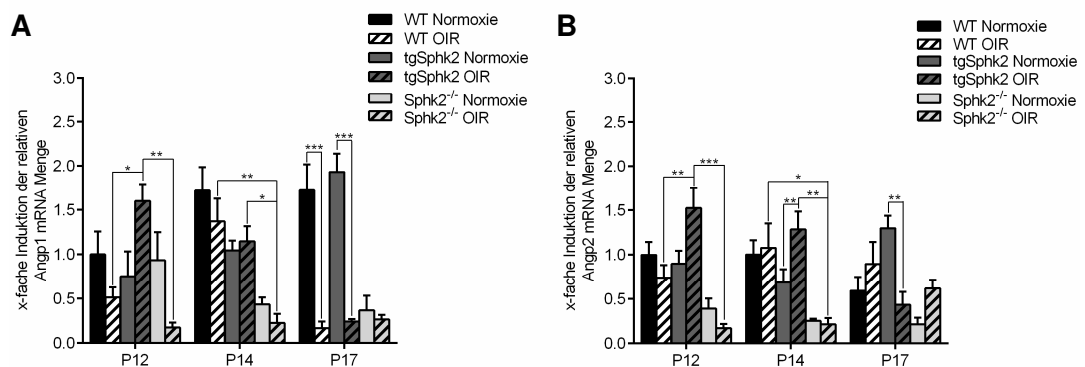


Abb. 42 Angpt1- und Angpt2-Expression in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen im OIR Modell. Retinae von tgSphk2 und Sphk2^{-/-} Mäusen wurden an P12, P14 und P17 des OIR Modells mittels qRT-PCR auf ihre (A) Angpt1 und (B) Angpt2 mRNA Expression untersucht, auf GAPDH normalisiert und als Vielfaches von WT P12 dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD; n=6/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001. (Modifiziert nach Eresch et al. (2018))

4. Diskussion

4.1 Auswirkung der Sphk2 Modulation auf die physiologische Angiogenese

S1P ist als Mediator der Angiogenese und Gefäßreifung etabliert (Hla, 2004) und für die physiologische Entwicklung der Retina essentiell (Simon et al., 2019). Dadurch gewinnen seine katalytischen Enzyme Sphk1 und Sphk2 sowie seine Rezeptoren zunehmend Aufmerksamkeit in Bezug auf ihren Beitrag zur Regulation zellulärer Reaktionen, die der Bildung gesunder Blutgefäßsysteme zugrunde liegen.

In der vorliegenden Dissertation wurde speziell die Rolle der Sphk2 in der Entwicklung des retinalen Gefäßnetzes untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Sphk2 die prominentere der beiden Isoformen in der Retina ist (3.1.1), was sich mit Daten aus dem ZNS deckt (Blondeau et al., 2007) und in einer neueren Publikation ebenso beschrieben ist (Porter et al., 2018).

Die weiteren Versuche wurden entsprechend in zwei gentechnisch veränderten Mauslinien vorgenommen. Dabei liegt einmal ein systemisches Sphk2-Defizit (Sphk2^{-/-}), durch einen globalen Sphk2 *knockout* in der Maus vor, während in der anderen transgenen Maus ein Überangebot an Sphk2 durch eine systemische Überexprimierung, basierend auf dem Einschreiben eines humanen Sphk2 Gens zusätzlich zum mauseigenen Gen (tgSphk2) besteht. Bei beiden Mausmutanten konnte diese genetische Veränderung in der Retina nachgewiesen werden (3.1.2). Weiterhin konnte eine Tendenz zur kompensatorischen Hochregulierung der Sphk1 in den Sphk2 *knockout* Tieren beobachten werden, während in den Sphk2 überexprimierenden Mäusen die Expression der mauseigenen Sphk2 verringert wurde (3.1.3). Dies zeigt, dass eine Veränderung in der retinalen Genexpression Kompensationsmechanismen nach sich zieht, was in dem erstgenannten Mausmodell bereits für andere Organsysteme beschrieben wurde (Schwalm et al., 2015).

Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Entwicklung des retinalen Gefäßbettes, welches durch Färbung der retinalen Blutgefäße und Analyse der Anzahl an Gefäßverzweigungen untersucht wurde. Hierbei zeigten die tgSphk2 Mäuse an P7 ein tendenziell dichteres Gefäßnetz, basierend auf der erhöhten Anzahl von Gefäßverzweigungen als Ausdruck einer beschleunigten Angiogenese (3.1.4). Vaskularisierung und Retinogenese sind eng miteinander verbunden und Entwicklungsstörungen im Gefäßbett wirken sich auf die Entwicklung der Retina aus und umgekehrt (Saint-Geniez and D'Amore, 2004; Stahl et al., 2010). So können frühe vaskuläre Veränderungen zu morphologischen und damit funktionellen Veränderungen in den drei Schichten der Retina führen. Eine Kondensierung der Schichten ist in der retinalen

Entwicklung einer der letzten Schritte (Heavner and Pevny, 2012). Durch Differenzierung, Migration und Apoptose werden die locker geformten Zellschichten bis P17 verdichtet und es bilden sich deutliche Grenzen zwischen nukleären und plexiformen Bereichen der Retina.

Die Analyse der INL und ONL zeigt, dass eine solche Kondensierung in den tgSphk2 Mäusen während des Beobachtungszeitraums nicht mehr auftritt, sie aber bereits an P12 signifikant dichtere Schichten aufweisen. Eine solche Veränderung in den retinalen Schichten kann diverse Gründe haben. Zum einen kann eine beschleunigte Proliferation und Differenzierung zugrunde liegen, also eine beschleunigte Retinogenese, andererseits könnten aber auch apoptotische Vorgänge dafür verantwortlich sein. Auf Basis der Zellkernfärbung scheinen die retinalen Schichten jedoch morphologisch normal entwickelt und da die tgSphk2 eine beschleunigte Angiogenese mit gesund erscheinendem Gefäßbett aufweist, sowie korrespondierend erhöhte retinale Spiegel des pro-proliferativen S1Ps (siehe 3.1.6), kann in diesem Fall eher eine beschleunigte als eine fehlerhafte Retinogenese angenommen werden, die möglicherweise dem im OIR Modell beobachteten geringeren Gefäßverlust in der Phase des Sauerstoff-Überangebots zugrunde liegt.

Im Gegensatz dazu zeigten die Sphk2^{-/-} Mäusen eine verzögerte Angiogenese an P7 mit einer Tendenz zu einer verringerten Anzahl von Gefäßverzweigungen. Da an P7 Retinae untersucht wurden, an denen bereits der superfizielle Plexus vollständig ausgebildet ist, was in allen drei Mauslinien zu beobachten war, hätten Analysen von früheren Entwicklungstagen vielleicht einen deutlicheren Unterschied in der Vaskularisierung der Retinae zwischen den drei untersuchten Genotypen aufzeigen können. Dies wäre jedoch wahrscheinlich von eingeschränkter physiologischer Relevanz durch das Angleichen der Gefäßsysteme bis P7. Insgesamt erschien in allen drei Mauslinien das vaskuläre Gefäßbett morphologisch normal entwickelt.

Die Analyse der Schichtdicken in den Sphk2^{-/-} Mäusen ergab, dass diese ebenfalls ab dem ersten Beobachtungstag (P12) verringert waren. Jedoch war in der INL noch eine weitere Abnahme der Schichtdicke zwischen P12 und P17 zu beobachten, auch erscheint die Verteilung der Zellkerne in der INL nicht so homogen wie bei den WT Mäusen und die INL ist an P17 deutlich reduziert. Da die INL die Zellkörper verschiedener retinaler Neuronen beinhaltet, könnte dies auf Veränderungen im Neuronenpool und damit in der Signalweiterleitung in der Netzhaut hinweisen. Die INL beinhaltet jedoch auch die Zellkörper der radial durch die Retina verlaufenden Müllergliazellen, die nicht nur das Stützgerüst der Retina sind, sondern auch eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Funktionalität einnehmen. Müllergliazellen bieten sowohl strukturelle, trophische als auch metabolische Unterstützung, halten die Homöostase des retinalen extrazellulären Mediums aufrecht,

recyclen Abfallprodukte und fungieren sowohl als Lichtkollektoren als auch als Lichtleiter (Reichenbach and Bringmann, 2013; Simon et al., 2015; Vessey et al., 2011).

Eine Veränderung in der INL könnte auf eine Veränderung in den Müllerzellen hinweisen, die auf die meisten retinalen Pathologien reagieren und aktiv werden, was wiederum Auswirkungen auf die Funktion der Retina hätte.

Insgesamt scheint der *knockout* der Sphk2 in diesen Mäusen zu einer Verzögerung der retinalen Vaskularisierung und einer Veränderung in der Retinogenese zu führen, wahrscheinlich mit einer Veränderung an Neuronen und Gliazellen der INL. Zur genaueren Bestimmung, die nicht im Fokus dieser Arbeit lag, könnten hierfür Färbungen auf verschiedene retinale Zelltypen und ihre Differenzierungsstadien in frühen Entwicklungsstadien der Netzhaut gemacht werden.

4.1.1 Beteiligung der Sphk2 am Sphingolipidgleichgewicht

Extrazelluläres S1P reguliert eine große Anzahl verschiedenster zellulärer Prozesse und physiologische Funktionen mittels der GPCRs, einschließlich des vaskulären Systems (Gaengel et al., 2012; Skoura et al., 2007) und spielt auch in der Entwicklung der Retina eine große Rolle (Rotstein et al., 2010). Da die Sphk2 eines der beiden Isoenzyme ist, dass die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P leistet, sind die Level seines Produkts und deren Vorläufer in der Retina aber auch im Plasma von großem Interesse. Aus der Literatur ist bekannt, das Sphingomyelin mit etwa 2,4-2,5% der totalen retinalen Lipide das Sphingolipid mit der höchsten Konzentration in der Retina ist (Fox et al., 2006).

Im Gewebe der untersuchten Retinae spiegelt sich dies in den deutlich höheren Konzentrationen von Sphingalin und Sphingosin, mehr oder weniger direkten Edukten für die Bildung von S1P, wider. Erhöht sind die Konzentrationen dieser beiden Sphingolipide vor allem in den Sphk2^{-/-} Mäusen. Allgemein scheint der *knockout* der Sphk2 mehr Einfluss auf die retinalen Sphingolipidkonzentrationen zu haben als die Überexprimierung der Sphk2, was die Bedeutung dieses Isoenzym für den retinalen Sphingolipidstoffwechsel unterstreicht.

Das Fehlen des Enzyms, welches für die Umsetzung von Sphingalin und Sphingosin zu ihren phosphorylierten Nachfolgern verantwortlich ist, verlagert das Gleichgewicht auf deren non-proliferative, apoptotische Seite im Gewebe und Plasma, was die verlangsamte Angiogenese und die morphologischen Veränderung in der Schichtung der Retina erklären könnte. So ist von Sphingosin bekannt, dass dieses den Zelltod von Photorezeptoren und Amakrinzellen induziert (Abraham et al., 2010). Dies ist besonders interessant hinsichtlich der Veränderungen in der INL dieser Mäuse, da die Zellkörper der Amakrinzellen in der INL

liegen, und die zuvor beschriebene Reduzierung der INL somit auf den Verlust von Amakrinzellen aufgrund der hohen Sph-Level im Gewebe zurückzuführen sein könnte.

Hinsichtlich der retinalen S1P-Level liegt in den Sphk2^{-/-} Mäusen überraschenderweise eine Tendenz zu höheren S1P-Spiegeln als bei WT Mäusen vor, welche wahrscheinlich auf die beobachtete kompensatorische Hochregulierung von Sphk1 vor allem in der Frühphase (bis P12) zurückzuführen ist. Diese ist in der Retina zwar von vorneherein nicht stark exprimiert (Porter et al., 2018), weist aber dennoch einen Anstieg auf (siehe 3.1.3). Ebenso könnte auch eine veränderte Sphk1 Aktivität in den Sphk2^{-/-} Mäusen dem Anstieg an phosphorylierten Sphingolipiden zugrunde liegen.

Im Plasma der Sphk2^{-/-} Mäuse liegt ebenfalls eine stark erhöhte Akkumulation von S1P vor, (siehe 3.1.6), die auf die postulierte kompensatorische Hochregulierung der Sphk1 zurück zu führen sein könnte (Schwalm et al., 2017; Zemmann et al., 2006). Plasmatisches S1P wird vor allem von Erythrozyten und ECs hergestellt (Venkataraman et al., 2008) und eine Hochregulierung der nicht vom *knockout* betroffenen Sphk Isoform kann in diesen Zellen zu einer stark erhöhten Produktion von S1P führen, welches dann wiederum exportiert wird und zu einem plasmatischen Anstieg führt. Diese können dann durch ihre GPCRs in den Zellen der retinalen Blutgefäße verschiedenste Signalwege aktivieren, wodurch trotz der hohen Level an proapoptotischen Sphingolipiden sowohl im retinalen Gewebe als auch im Plasma ab Entwicklungstag P14, Zell- und damit auch Gefäßwachstum gefördert werden könnten und Entwicklungsstörungen verhindert oder zumindest gegenreguliert werden. Somit erlaubt das hier verwendete Modell leider keine isolierte Betrachtung des Effekts einer reinen Sphk2 Modulation, wie bei der Betrachtung der S1P-Rezeptorexpressionsprofile noch deutlicher wird.

Weiterhin zeigen die erhöhten basalen S1P-Level im Plasma der Sphk2^{-/-} Mäuse eine mögliche Beteiligung der Sphk2 an der Elimination von S1P aus dem Blutstrom auf (Kharel et al., 2015; Schwalm et al., 2017; Sensken et al., 2010) die genaueren Mechanismen hierfür sind jedoch noch unbekannt. Allgemein ist die S1P-Konzentration im Plasma höher als im Gewebe (Hla et al., 2008). Dieser ‚vaskuläre Gradient‘ könnte auch bei der retinalen Gefäßsprossung von Bedeutung sein, da im Blut enthaltenes S1P den S1PR1 an ECs bereits gebildeter Gefäße aktiviert, was ein wesentliches Stopp- und Reifungssignal darstellt, während eine Herunterregulierung von S1PR1 in den Tip-Zellen und eingeschränkter Blutfluss an der angiogenen Front zu Gefäßwachstum führt (Gaengel et al., 2012). Man könnte also postulieren, dass die höheren Konzentrationen von S1P im Plasma der Sphk2^{-/-} zu einer verfrühten Verlangsamung des Gefäßwachstums führen.

In den tgSphk2 Mäusen zeigte sich ein anderes Bild hinsichtlich der Sphingolipidkonzentrationen im retinalen Gewebe und Plasma. Der *knockin* eines zweiten Sphk2 Gens führt zu den zu erwartenden höheren S1P-Konzentrationen im Gewebe, während die drei anderen untersuchten Sphingolipide keine Veränderung in ihren retinalen Leveln aufweisen. Das Gleichgewicht verlagert sich hier also auf die proliferative Seite. Eine beschleunigte Proliferation, gefolgt von Migration und Differenzierung, induziert durch S1P, könnte der verfrühten Kondensierung der INL und ONL zugrunde liegen, diese also schneller in einen reiferen Entwicklungsstand bringen.

Im Plasma dieser Mäuse fällt vor allem die unveränderten S1P-Level im Vergleich zu Wildtyptieren auf. Basierend auf der postulierten Beteiligung von Sphk2 am Abbau von zirkulierendem S1P, kann hier vermutet werden, dass das Überangebot an Sphk2 zu einer anhaltenden Klärung von S1P aus dem Blutstrom beiträgt, wodurch keine Akkumulation stattfinden kann. Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von pro-proliferativem S1P, vor allem bei gleichzeitig fehlender Erhöhung von Sphingosin und Sphinganin, gemeinsam mit unveränderten Plasmaspiegeln und somit fehlender Beeinflussung der Gefäßproliferation von dieser Seite können dazu führen, dass insgesamt eine frühere und raschere Gefäßbildung in diesen Mäusen vorliegt.

4.1.2 Veränderungen der S1P-Rezeptorexpression durch Sphk2 Modulation

Da S1P viele seiner biologischen Funktionen über seine GPCRs ausübt, wurden deren Expression in ganzen Retinae, die auch das retinale vaskuläre System beinhalten analysiert, um genauer darüber Aufschluss zu bekommen, welche Signalwege durch die Modulation der Sphk2 und der jeweiligen Veränderungen in den Sphingolipidspiegeln beeinflusst werden.

Der S1PR1 ist der bei weitem am stärksten exprimierte S1P-Rezeptor in der Netzhaut (S1PR1>>S1PR3> S1PR2 = S1PR4), was mittlerweile durch eine zweite Arbeitsgruppe bestätigt wurde, die sich in ihren Untersuchungen auf die drei ubiquitär exprimierten S1P-Rezeptoren S1PR1-3 beschränkte (Porter et al., 2018). Über die Expression und Funktion von S1PR4 jenseits von Leukozyten ist bislang noch nicht viel bekannt. Erstaunlicherweise fanden wir relevante und durch Sphk2 Überexpression und OIR äußerst stark modulierte Expressionsniveaus dieses Rezeptors in den Retinaproben.

Während der physiologischen Gefäßentwicklung zeigte S1PR4 an den ersten beiden Beobachtungstagen P12 und P14 ein Expressionsniveau auf dem Level von S1PR2 und S1PR3, dann aber einen deutlichen Anstieg in seiner Expression ab dem Entwicklungstag P17, zum Zeitpunkt fortgeschrittener Ausreifung des Gefäßsystems, nahezu auf das Expressionsniveau von S1PR1. Auch die Expression der anderen Rezeptoren war nicht konstant über die retinale Entwicklung hinweg, wenngleich die Dynamik deutlich geringer

ausgeprägt war als beim S1PR4, wodurch je nach Entwicklungszeitpunkt unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Diese Diversität in der Rezeptorexpression und der Aktivierung divergenter Signalwege ist sicher eine der Ursachen der pleiotropen Effekte, die S1P über seine Rezeptoren ausübt.

S1PR1 wird in ECs stark exprimiert, so dass allein das dichtere Gefäßnetz in den tgSphk2 Mäusen ein höheres S1PR1 Expressionsniveau bedingen könnte. Interessanterweise liegt jedoch vor allem an den ersten beiden Beobachtungstagen P12 und P14 eine verringerte S1PR1-Expression vor, was gut zu den Befunden von Gaengel et al. (2012) passt, da bei Gefäßsprossung geringe S1PR1-Level aufzufinden sind. Ausgehend davon könnte in den tgSphk2 Mäusen ein Phänotyp mit vermehrte Gefäßsprossung vorliegen.

Ein hochinteressanter Befund ist die im Vergleich zu den WT Mäusen nochmals ausgeprägtere Hochregulation des S1PR4-Rezeptors, die im Gegensatz zu den WT Mäusen auch schon bereits an P12 und P15 deutlich und an P17 ungebrochen ist. Das frühere Einsetzen der S1PR4 Hochregulation im Vergleich zu den Wildtyptieren könnte als weiterer Hinweis auf eine Bedeutung für die Gefäßreifung interpretiert werden. Die Rolle von S1PR4 in der vaskulären Entwicklung ist jedoch noch völlig unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Interessanterweise sind in den Sphk2^{-/-} Mäusen alle Rezeptoren stark vermindert in ihrer Expression und bleiben es auch über die drei Beobachtungstage bis auf S1PR1, der an P17 das Level von WT und tgSphk2 erreicht. Möglicherweise ist diese drastische Herunterregulation durch das Überangebot von S1P im Plasma im Vergleich zu Wildtyptieren bedingt. Eine solche Veränderung in den Rezeptoren hat definitive Auswirkungen auf die Entwicklung des Blutgefäßsystems und der Retina. Die hohen plasmatischen S1P Konzentrationen könnten theoretisch zudem VEGFR transaktivieren. Da jedoch dafür S1PR3 notwendig ist (Jin et al., 2018), sind die Möglichkeiten dieser Kompensation ebenfalls eingeschränkt, was eine der Ursachen des in dieser Arbeit bei den Sphk2^{-/-} Mäusen beobachteten verzögerten retinalen Gefäßwachstums sein könnte.

4.1.3 Sphk2 beeinflusst die Expression vaskulärer Wachstumsfaktoren

Das trotz der deutlichen Veränderungen in den Expressionsmustern der S1P-Rezeptoren sowohl die tgSphk2 als auch die Sphk2^{-/-} keine starken phänotypischen Veränderungen im vaskulären System, zumindest an P7, aufzeigen, könnte zu Teilen auf die wichtigsten vaskulären Wachstumsfaktoren wie VEGF und das Angpt/Tie2 System zurückzuführen sein. Ein Zusammenspiel zwischen S1P, seinen Rezeptoren S1PR1 und 3 und VEGF wurden bereits beschrieben (Gaengel et al., 2012; Jin et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch weder in den tgSphk2 noch in den Sphk2^{-/-} Mäusen erhöhte VEGF-Level festgestellt werden. In den tgSphk2 Mäusen liegt die Expression von VEGF auf einem ähnlichen Level wie bei den WT, was bedeutet, dass deren „hyperproliferativer“ Phänotyp mit beschleunigter Ausreifung des retinalen Gefäßnetzes zumindest zu den beobachteten Auswertungszeitpunkten nicht (mehr) durch VEGF getrieben ist (siehe 3.1.8).

Hinsichtlich des Angpt/Tie Systems, zeigten die tgSphk2 ebenfalls kaum Unterschiede im Vergleich zu den WT, so war Angpt1, welches in der Gefäßstabilisierung und -reifung eine wichtige Rolle spielt (Huang et al., 2002), nicht signifikant erhöht oder verringert. Dagegen zeigte die Expression des gefäßdestabilisierenden Angpt2 (Hackett et al., 2002) ab P17 in diesen Mäusen eine deutliche Erhöhung und trägt damit an diesem späten Entwicklungstag noch zu Gefäßsprossung bei (siehe 3.1.8). Gleichzeitig muss jedoch auch das Vorkommen von Angpt1 und VEGF in Betracht gezogen werden, da Angpt1 den Aktivierungszustand von Tie2 bestimmt. Da VEGF zu diesem Zeitpunkt in den tgSphk2 Mäusen auf normalem Level exprimiert wird, führt die erhöhte Angpt2-Expression in dessen Beisein und geringerer Expression des proliferationslimitierenden Angpt1 Anteil zu Gefäßwachstum, was die Annahme eines angiogenen Phänotyps in den tgSphk2 Mäusen unterstützt und damit die wichtige Rolle der Sphk2/S1P/S1PR Achse in der Angiogenese hervorhebt.

In den Sphk2^{-/-} Mäusen ist die VEGF-Expression dagegen stark vermindert, ebenso wie Angpt2 und das initial auf WT Niveau exprimierte Angpt1, welches ab P14 stark abnimmt (siehe 3.1.8). Der *knockout* der Sphk2 führt zusätzlich zur Dysregulation der S1P-Rezeptorexpression zu einer verringerten Expression der vaskulären Wachstumsfaktoren, was sich jedoch ohne zusätzliche Belastung durch ein Krankheitsmodell noch nicht in der Morphologie des Gefäßnetzes und dessen Entwicklung widerspiegelt. Die Expression von Angpt1 an P12 könnte zusammen mit den hohen Leveln an plasmatischen S1P zur Aufrechterhaltung der Gefäßproliferation über VEGFR Transaktivierung via noch ausreichend exprimiertem S1PR3 wirken, während normalerweise stattfindende wachstumsregulierende Effekte von S1P via S1PR1 auf den VEGF-Signalweg abgemildert sind. Dies lässt zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass die genetische Modulation der Sphk2 und damit einhergehende Veränderungen in den retinalen bzw. plasmatischen S1P-Spiegeln und den Expressionsmustern der S1PRs und vaskulärer Wachstumsfaktoren die Angiogenese beeinflusst. Dies scheint jedoch unter physiologischen Bedingungen, möglicherweise durch die Aktivierung von Kompensationsmechanismen nur zu leichten morphologischen Veränderungen führen.

4.2 Auswirkung der Sphk2 Modulation auf die pathologische

Angiogenese

Inwieweit die zuvor beschriebene angiogene Funktion der Sphk2/S1P/S1PR Achse auch eine Rolle bei der pathologischen Angiogenese und Neovaskularisation spielt, wurde im weiteren Teil dieser Arbeit untersucht. Diesem zugrunde liegen verschiedene Studien, die die funktionelle Rolle von S1P im Auge untersuchten und deren wichtigen Beitrag in retinalen Erkrankungen (Simon et al., 2015; Stiles et al., 2016), retinaler und choroidaler NV (Xie et al., 2009) und in profibrotischen und proinflammatorischen Vorgängen in Zellen des RPE (Aoki et al., 2016; Qiao et al., 2012) aufzeigten.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des OIR Modells gezeigt werden, dass eine genetische Modulation von Sphk2 mit den entsprechend veränderten S1P-Spiegeln und Veränderungen in der S1PR-Expression ausgeprägte Veränderung in der Angiogenese und der NV im OIR Modell mit sich bringt, wie sie auch durch pharmakologische Interventionen mit den wirksamsten derzeit angewendeten Therapieprinzipien erreicht werden. Leider können aufgrund der multiplen kompensatorischen Veränderungen in den beiden Mausmodellen mit jeweils globalem *knockout* bzw. Überexpression der Sphk2 in Bezug auf die zugrundeliegenden Mechanismen weiterhin nur Hypothesen aufgestellt werden.

In den tgSphk2 Mäusen zeigte sich neben der beschleunigten pathologischen Angiogenese, belegt durch schnellere Verkleinerung der avaskulären Zone, auch eine beschleunigte und chaotische NV (siehe 3.2.1). Weiterhin waren auch mehr Blutungszonen zu beobachten und der Gesamteindruck der Blutgefäße erschien chaotisch. Ferner sind zu einem verfrühten Zeitpunkt (P14) NV Zonen und *cluster* und *tufts*, also Blutgefäße die präretinal in den Glaskörper einwachsen, vorhanden. Dieser angiogene Phänotyp der tgSphk2 mit neovaskulären Auswüchsen stellt praktisch eine Verstärkung der zuvor unter physiologischen Bedingungen gemachten Beobachtungen dar und weist somit weiterhin Ähnlichkeit zu dem zuvor erwähnten *hyper-sprouting* Phänotyp der Mäuse mit endotheliale S1PR1 *knockout* von Gaengel et al. (2012) auf. Dieser Phänotyp scheint unter pathologischen Bedingungen verstärkt zu sein.

Insgesamt scheinen die tgSphk2 eine geringere Sensibilität gegenüber dem Gefäßverlust in der Hyperoxie aufzuweisen, was auf die beschleunigte Angiogenese und damit wahrscheinlich auch beschleunigte Gefäßreifung zurückzuführen sein könnte.

In den Sphk2^{-/-} Mäusen ist zwischen P12 und P14 erst einmal kein eindeutiger Unterschied hinsichtlich der VO zu den WT Mäusen zu erkennen, jedoch zeigt die Analyse der NV und die Morphologie, dass in diesen Mäusen eine deutliche Störung im Blutgefäßwachstum vorliegt (siehe 3.2.1). Vor allem an P17 wird dies durch den Mangel an normal

ausgebildeten Gefäßen und den deutlich verringerten NV bei gleichzeitig übermäßigem Vorkommen von *clustern* und *tufts* deutlich. In diesen Mäusen lag schon unter physiologischen Bedingungen eine deutliche Störung in der Expression wichtiger Faktoren vor. Nachdem es dort morphologisch noch keine größeren Auswirkungen hatte, scheinen die Kompensationsmechanismen unter Provokation durch das Krankheitsmodell nicht mehr auszureichen, so dass hier keine effektiven Reparaturvorgänge mehr zu beobachten sind.

4.2.1 Das Sphingolipidgleichgewicht im OIR Modell

Hinsichtlich dieser schweren pathologischen Ausprägung der Angiogenese, NV und Morphologie des Gefäßsystems im OIR Modell sind die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen von großem Interesse. Das OIR Modell mit seiner initialen hyperoxischen Phase bis P12 und der nachfolgenden hypoxischen Phase ab P14 hat in den WT Mäusen keinen direkten Einfluss, zumindest auf die mRNA Expression von Sphk1 und Sphk2. Leider war aufgrund der geringen Probemenge keine Untersuchung auf Protein- oder Aktivitätsebene möglich, das Fehlen einer relevanten Modulation der S1P-Konzentration in der Retina im Verlauf der OIR Beobachtungstage spricht jedoch gegen eine physiologisch relevante translationale oder posttranslationale Regulation.

Auch in den tgSphk2 Mäusen war keine Veränderung der Sphk1- und Sphk2-Expression zu beobachten (siehe 3.2.2). Einzig in den Sphk2^{-/-} Mäusen, die unter physiologischen Bedingungen eine tendenziell höhere Sphk1-Expression aufwiesen, scheint im OIR Modell an allen Untersuchungstagen die Sphk1 eher herunterreguliert zu werden. Neben dem Sphk2 *knockout*, scheint das Erkrankungsmodell also in diesen Mäusen zusätzlich zu einem Sphk1 Mangel zu führen, was zur drastisch fehlerhaften Gefäßbildung beisteuern könnte, da bekannt ist, dass ein Sphk1/Sphk2 Doppel*knockout* zu erheblichen Defekten führt (Mizugishi et al., 2005; Okada et al., 2009). Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Abfall in der Sphk1-Expression Ausdruck des bereits eingetretenen schweren Gefäßverlusts ist.

Auch hinsichtlich der Sphingolipidkonzentrationen im retinalen Gewebe scheint das OIR Modell an sich im WT betrachtet keine relevanten Auswirkungen zu haben, die Unterschiede in den jeweiligen Sphingolipidkonzentrationen zeigen keine signifikanten Veränderungen. Nur am letzten Untersuchungstag, P17, stieg sowohl die Sphingalin als auch die Sph Konzentration im retinalen Gewebe unter hypoxischen Bedingungen an. Sphk2 relokalisiert unter Stressbedingungen zum ER und versorgt dort durch die lokale Produktion von S1P den *salvage* Weg, der ultimativ zur Generierung von proapoptotischen Cer über Sph führt (Maceyka et al., 2005) und damit deren zelluläre Konzentrationen beeinflusst. Außerdem ist bekannt, dass unter anderem bei oxidativem Stress die Sph

Produktion ansteigt, was vor allem auf die rapide Deacetylierung von Cer zurückzuführen ist (Cuvillier et al., 2000; Hannun and Obeid, 2018). Die höheren Konzentrationen von Sph und Sphinganine deuten damit eine Verlagerung des Sphingolipidgleichgewichts auf die proapoptotische Seite an.

Im Plasma scheint vor allem dhS1P durch das OIR Modell in WT beeinflusst zu sein, dieses ist unter hyperoxischen Bedingungen, also an P12, und auch an noch an P14 erhöht, zudem ist an P14 auch ein Anstieg von Sph zu erkennen.

Betrachtet man nun die Sphk2 modulierten Mäuse, so sind auch dort keine größeren Veränderungen in den retinalen Gewebekonzentrationen der Sphingolipide im OIR Modell zu erkennen (siehe 3.2.3.1).

In den Sphk2 überexprimierenden Mäusen ist nur in der Sphinganinekonzentration an P12 eine deutliche Verringerung zu beobachten. An diesem Untersuchungstag ist die Retina noch hyperoxisch, da die Tiere erst dann aus der 75% Sauerstoffumgebung genommen wurden, wodurch sich vermehrt radikale Sauerstoffspezies (ROS) bilden, was unter anderem durch Cer, dessen Vorläufer Sphinganine ist, vermittelt wird (Chen et al., 2014) und damit apoptotische Signalwege aktiviert werden. Die Verringerung der Sphingolipidkonzentrationen, die bereits unter physiologischen Bedingungen im Plasma der tgSphk2 Mäuse festgestellt wurde, ist auch unter OIR Bedingungen zu finden. Auch hier hat das OIR Modell keinen weiteren Einfluss auf die Konzentrationen der untersuchten Sphingolipide (siehe 3.2.3.2).

In den Sphk2^{-/-} Mäusen ist im OIR Modell nur in den retinalen S1P-Leveln an P12 eine Reduktion der Konzentration zu beobachten, dieses fällt jedoch nicht unter das Basislevel der WT Mäuse, weder unter Normoxiebedingungen noch unter Hypoxie. Die zuvor physiologischen Konzentrationen im retinalen Gewebe sind auch hier nicht beeinflusst durch das Krankheitsmodell (3.2.3.1). Im Plasma dieser Tiere zeigte sich an P14 eine erhöhte Sphinganinekonzentration, jedoch keine weitere Veränderung in den anderen Sphingolipiden im Verlauf des Modells (3.2.3.2). Insbesondere zeigt sich keine Modulation, der im Vergleich zum WT erhöhten S1P Plasmaspiegel, die bereits unter physiologischen Bedingungen festgestellt wurden. Möglicherweise tragen diese hohen S1P Plasmaspiegel mit ihrer bekannten gefäßstabilisierenden Wirkung dazu bei, dass es trotz drastischer Veränderung der vaskulären Wachstumsfaktoren schon unter Normoxie, im OIR zunächst nicht zu einem wesentlich größeren Gefäßverlust während der Hyperoxie kommt als in WT Mäusen.

4.2.2 S1P-Rezeptoren im OIR Modell

Betrachtet man die retinale Expression der S1P-Rezeptoren im OIR Modell, zeigt sich, dass gerade an P14, wo die NV beginnt, in den WT Mäusen der S1PR1, der als angiogenes Stoppsignal fungiert, herunterreguliert ist und damit die Sprossung von Gefäßen möglich ist (siehe 3.2.4). Gleichzeitig wird der S1PR2 stark hochreguliert während der S1PR3 eine tendenziell herunterreguliert wurde. Damit sind S1P-Rezeptoren 1 und 3, die an der Regulierung von Gefäßstabilisierung und -Integrität beteiligt sind verringert, während ihr Gegenspieler S1PR2 hochreguliert ist (Obinata and Hla, 2012). Bereits Skoura et al. (2007) beschrieben die Rolle von S1PR2 in physiologischer und pathologischer Angiogenese. Dabei zeigten S1PR2 *knockout* Tiere eine normale vaskuläre Entwicklung, unter pathologischen Bedingungen wurde jedoch deutlich geringere NV ausgebildet.

Die in dieser Arbeit verwendeten tgSphk2 Mäuse mit stark angiogenem Phänotyp zeigten jedoch keine Hochregulierung des S1PR2, im Gegenteil war dieser unter Normoxie und nach OIR deutlich geringer exprimiert als bei den WT Mäusen. Damit spielt der Signalweg über S1PR2 zwar eine wichtige Rolle in pathologischer Angiogenese, dieser ist jedoch nicht der einzige und wahrscheinlich auch nicht der wichtigste S1P-Rezeptor, da gerade in der Expression des bislang kaum untersuchten S1P-Rezeptor 4 eine starke Regulierung unter pathologischen Bedingungen beobachtet wurde.

Des Weiteren zeigten die S1PR4-Expressionslevel von WT Mäusen im OIR Modell eine starke Hochregulierung seiner Expression unter hyperoxischen Bedingungen, fiel zur hypoxischen Phase langsam ab und zeigte an P17 eine deutliche Verringerung (3.2.4). In den tgSphk2 Mäusen wurde zwar die initiale Hochregulierung nicht aufgefunden, die Expressierung von S1PR4 ist nicht mehr deutlich höher an P12 und 14 als die im Vergleich zu den WT Mäusen schon in der jeweiligen Normoxiekontrolle deutlich erhöhten Werte, jedoch ist die stark reduzierte Expressierung an P17 im Vergleich zu ihren jeweiligen Normoxiekontrollen auch hier aufzufinden. Damit scheint der Signalweg über den S1PR4 eine wichtige Rolle bei der Rückbildung der präretinalen Proliferationsareale und dem Abklingen der NV nach P17 im OIR Modell, welche in Mäusen beobachtet werden kann, zuspielen. Während wir anhand des Anstiegs im Lauf der Gefäßentwicklung bei WT Mäusen und anhand der bereits initial höheren Expressionsniveaus in den tgSphk2 Mäusen mit akzelerierter Gefäßentwicklung angenommen hatten, dass die S1PR4-Expression mit der Gefäßreifung korreliert, spricht die im OIR Modell auffallende Hochregulierung in Phasen rapider Reparationsvorgänge (P12 und P14) mit Herunterregulation am letzten Beobachtungstag eher gegen diese Hypothese und für eine Funktion in der Gefäßsystemreparatur.

Die Expression von S1PR1 in den tgSphk2 im OIR Modell ist, ähnlich wie unter physiologischen Bedingungen auf niedrigem Expressionsniveau und unterstützt damit die Theorie des *hyper-sprouting* Phänotyps in den tgSphk2 auch unter pathologischen Bedingungen. Erst zu P17 nähern sich die S1PR1 Expressionslevel dem Niveau der WT Mäuse an, was eine Nutzung des Signalwegs von S1P über S1PR1 bedeuten könnte, wodurch eine weitere durch VEGF induzierte exzessive Gefäßsprossung inhibiert werden könnte. Gleichzeitig ist ab P14 der S1PR3 stärker exprimiert. Jin et al. (2018) zeigten auf, dass S1PR3 für die Hochregulierung und Aktivierung von VEGFR-2 durch S1P notwendig ist und damit Angiogenese induziert. Die erhöhte S1PR3-Expression könnte damit zur NV in diesen Tieren beitragen.

In den Sphk2^{-/-} Tieren sind die Expressionslevel von S1PR1, S1PR2 und S1PR3 kaum durch das OIR Modell verändert. Nur der S1PR3 zeigt an P12 eine Tendenz zu höherer Expression, und die Expression des S1PR4-Rezeptors ist an P17 tendenziell angestiegen. Bislang sind für den S1PR4 im wesentlichen Funktionen von Leukozyten im Zusammenhang von Immunantwort und Entzündungsvorgängen bekannt (Graler et al., 1998; Kehrl et al., 2009). Die Tendenz zu einer Hochregulation an P17 in den Sphk2^{-/-} Mäusen spricht wie die anderen Befunde in WT Mäusen und tgSphk2 Mäusen für eine bislang noch nicht näher charakterisierte Funktion in der Gefäßneubildung.

4.2.3 Einfluss der Sphk2 auf vaskuläre Wachstumsfaktoren im OIR Modell

Die Phase der pathologischen Angiogenese im OIR Modell beruht auf der relativen Hypoxie, die in der ischämischen Retina vorliegt. Deshalb ist VEGF von großem Interesse in diesem Modell und Anti-VEGF-Therapien mit neutralisierenden Antikörpern sind der derzeitige Behandlungsstandard für gefäßproliferative Netzhauterkrankungen (Yamada et al., 1999). Aus der Literatur ist bekannt, dass VEGF im OIR Modell ansteigt (Skoura et al., 2007) und die in dieser Arbeit gemessenen Expressionswerte im WT bestätigen dies (siehe 3.2.5.1). Zu P12, wenn die Mäuse aus der Hyperoxie genommen werden, ist VEGF verringert, bis P14 wird die Expression deutlich hochreguliert, wodurch NV und Revaskularisierung induziert werden und bleibt auch an P17 noch auf hohem Expressionslevel.

Wie auch unter physiologischen Bedingungen zeigen die tgSphk2 Mäuse interessanterweise keine Veränderungen in ihrer VEGF-Expression, ab P14 ist zwar tendenziell ein Anstieg zu sehen, dieser ist jedoch sehr gering, vor allem in Vergleich mit den WT im OIR Modell. Damit kann die verstärkte Gefäßbildung, die in diesen Mäusen zu sehen ist, nicht alleine auf VEGF zurückzuführen sein. Der S1P Gradient (Gewebe < Plasma) und die verringerte S1PR1-Expression spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle

in diesem angiogenem Phänotyp, ebenso wie die im Vergleich zum WT erhöhte S1PR3-Expression und wahrscheinlich der Regulierung des S1PR4, dennoch sind auch weitere vaskuläre Wachstumsfaktoren von Interesse.

Bei den *Sphk2 knockout* Tieren konnte nur eine sehr geringe VEGF-Expression gemessen werden, und der bereits unter physiologischen Bedingungen beobachtete Mangel an vaskulären Wachstumsfaktoren ist auch im OIR Modell festzustellen (3.2.5.1). Trotz diesem Mangel an VEGF erscheinen auch in den *knockout* Tieren an P17 NV, dies könnte auf die beschriebenen hohen S1P Konzentrationen im Plasma beruhen, wodurch eine Transaktivierung von VEGFR-2 durch S1P möglich ist, jedoch ist S1PR3 in den *knockout* Tieren nur gering exprimiert. Weiterhin ist ab P17 S1PR1 auf einem ähnlichen Expressionslevel wie der der WT, was wiederum zu einer Inhibition des VEGF Signalweges über die S1P/S1PR1 führen kann. Diese duale Rolle von S1P erschwert die genaue Feststellung, welche Signalwege hier aktiviert und inhibiert werden.

Das Angpt/Tie System, welches wie bereits erwähnt in Wechselwirkung mit VEGF arbeitet, könnte hierbei eine Rolle zu spielen. Das OIR Modell selbst hat nur geringe Auswirkung auf die Expression von Angpt1 und Angpt2, wie bei den WT beobachtet (siehe 3.2.5.2).

In den *tgSphk2* Mäuse dagegen ist das gefäßstabilisierende Angpt1 im OIR Modell deutlich erhöht, dies trägt zur Desensibilisierung des Blutgefäßsystems gegenüber von Stressfaktoren wie hohen Sauerstoffkonzentrationen bei, was der beobachteten geringeren Vaso-Obliteration und damit kleineren avaskulären Zone zugrunde liegen könnte. Ab P14 sinkt jedoch die Angpt1-Expression unter pathologischen Bedingungen und ist an P17 kaum noch detektierbar. Dies führt dazu, dass angiogene Faktoren, wie VEGF, zusammen mit den niedrigeren und somit die Gefäßsprossung begünstigenden S1P Plasmaleveln und der niedrigen S1PR1-Expression, was die Sensibilität der ECs gegenüber angiogener Faktoren erhöht (Gaengel et al., 2012), eine starke Gefäßsprossung begünstigen. Ebenso wie die erhöhte S1PR3-Expression, welche wiederum für die Aktivierung von VEGFR-2 durch S1P nötig ist (Jin et al., 2018).

Gleichzeitig ist auch das gefäßdestabilisierende Angpt2 unter OIR Bedingungen an P12 und P14 hochreguliert, was nötig ist für die Gefäßsprossung. Dies könnte im Zusammenspiel mit VEGF früher NV induzieren und zu dem verstärkten, chaotischen Gefäßwachstum beitragen. An P17 ist Angpt2, wie auch Angpt1 herunterreguliert was zu einer allgemeinen Gefäßdestabilisierung führt und sich in den *tgSphk2* in den massiven Blutungszonen zeigt.

Bei den *Sphk2^{-/-}* Mäusen zeigt sich auch für dieses System sowohl was Angpt1 als auch Angpt2 angeht eine Mangelexpression im OIR Modell. Zusammen mit dem VEGF Mangel und den Veränderungen in den S1P/S1PR Signalwegen entsteht so das beobachtete

massive fehlerhafte Gefäßwachstum, da für die Ausbildung und Modulierung neuer gesunder Blutgefäße ein Zusammenspiel zwischen Angpt/Tie2 und VEGF notwendig ist (Hackett et al., 2002). Erst an P17 steigt die Expression von Angpt2, dieses verursacht aber in der Abwesenheit von VEGF Vasoregression (Oshima et al., 2005), wodurch die bis P14 noch vorhanden Gefäße auch verloren gehen.

Interaktionen zwischen S1P, S1PRs und vaskulären Wachstumsfaktoren sind bekannt (Fischl et al., 2019; Lebman and Spiegel, 2008). So inhibiert S1P über S1PR1 die VEGF-vermittelte Gefäßsprossung als Teil eines negativen Feedbackloops und induziert dadurch vaskuläre Stabilisierung in ECs (Gaengel et al., 2012), während S1PR3 Signalisierung notwendig ist für die VEGFR-2 Aktivierung, welche Angiogenese fördert (Jin et al., 2018) und S1PR2 als Gegenspieler dieser beiden arbeitet (Gandy et al., 2013). Diese Komplexität und Diversität der Sphk/S1P/S1PRs Signalwege zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit.

Um die genauen Mechanismen, die diesen angiogenen Veränderungen durch die Modulation der Sphk2 zugrunde liegen zu verstehen, wären weitere Experimente mit günstiger Weise zellspezifischem und konditionellem *knockout* und Überexpression und pharmakologischer Modulation der einzelnen S1P-Rezeptoren notwendig.

5. Zusammenfassung

Pathologisches Gefäßwachstum ist eine der Hauptursachen für Erblindung in ischämischen Retinopathien, eine diverse Gruppe von Erkrankungen, zu der auch die Frühgeborenenretinopathie (ROP) gehört, bei denen Gefäßverschlüsse oder Durchblutungsstörungen eine retinale Hypoxie mit Neovaskularisation (NV) verursachen. Der Hypoxie-induzierte vaskuläre endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) ist dabei nach derzeitigem Kenntnisstand der wichtigste angiogene Faktor. Daneben spielt auch der Signalweg über den Tyrosinkinase-Rezeptor 2 (Tie2) eine entscheidende angiogene Rolle. Dabei regulieren der Tie2 Ligand Angiopoietin 1 (Angp1) und der Antagonist Angiopoietin 2 (Angpt2) Gefäßstabilisierung und Destabilisierung, und agieren im Zusammenspiel mit VEGF.

Sphingolipide sind neben ihrer Funktion als strukturelle Membrankomponenten auch als intra- und extrazelluläre Botenstoffe bekannt. Vor allem das bioaktive Sphingosin-1-Phosphat (S1P) reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse, zu denen auch Proliferation, Zellüberleben und Angiogenese gehören. Es vermittelt seine biologischen Effekte über seine fünf Rezeptoren (S1PR1–5) und wird durch zwei ubiquitär exprimierte Sphingosinkinasen (Sphk) synthetisiert, die sich in ihren subzellulären Lokalisierungen und Gewebeexpressionen unterscheiden. Im retinalen Gefäßwachstum wurde in den letzten Jahren der S1P/S1PR1 Signalweg als wichtiger die Angiogenese inhibierender Signalweg etabliert, während eine Reduktion der Signaltransduktion Gefäßsprossung verstärkt. Damit ist das S1P generierende Enzym Sphk2, welches das prominentere in neuronalem Gewebe und damit auch der Retina ist, von großem Interesse und dessen Einfluss auf physiologische und pathologische Angiogenese war Hauptaugenmerk dieser Arbeit.

Dazu wurden im ersten Teil zwei gentechnisch veränderte Mauslinien in physiologischer Angiogenese untersucht. Die transgene Sphk2 (tgSphk2) Maus, bei der das zusätzliche Einschreiben des humanen Sphk2 Gens, eine systemische Sphk2 Überexpression erzeugt und die Sphk2 *knockout* (Sphk2^{-/-}) Maus, bei der keine Expression der Sphk2 vorliegt. Allgemein zeigen die tgSphk2 Mäuse eine beschleunigte Angiogenese, bedingt durch einen S1P Gradienten mit im Gewebe erhöhten S1P Konzentrationen, ohne erhöhte VEGF-Expression. Die verringerte S1PR1-Expression zusammen mit den veränderten S1P Leveln deuten auf einen *hyper-sprouting* Phänotyp hin. Die Sphk2^{-/-} Mäuse zeigten dagegen eine eher verlangsamte Angiogenese, erhöhte plasmatische S1P Konzentrationen, bedingt durch eine kompensatorische Regulierung der Sphk1 und dramatische Mangelexpression der vaskulären Wachstumsfaktoren und der Rezeptoren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden diese gentechnisch veränderten Sphk2 Mäuse auf ihre pathologische Angiogenese untersucht. Dazu wurde das Sauerstoff-induzierte Retinopathie (OIR) Modell verwendet, welches die Symptomatik der ROP nachahmt. Hierzu wurden die Mäuse vom postnatalen Tag (P) 7 bis 12 in einer hyperoxischen Umgebung gehalten (75% O₂), was zu Vaso-Obliteration (VO) und Regression bereits vorhandener Blutgefäße führt. Nach Rückkehr zur Raumluft entwickelte sich so eine relative Hypoxie in der Retina, welche NV induziert. Bei den tgSphk2 Mäusen zeigte sich eine geringere VO und eine frühere und stärker ausgeprägte NV mit chaotischer Morphologie des Blutgefäßnetzwerkes. Dies ist einerseits auf den *hyper-sprouting* Phänotyp zurückführen, aber auch auf die zu Beginn der hypoxischen Phase erhöhten S1PR3-Expression, was zur Aktivierung von VEGF-R und damit dessen angiogenem Signalweg beiträgt, auch wenn die VEGF-Expression im Gegensatz zu Wildtyp Tieren im Zuge des OIR Modells nicht ansteigt. Ebenso begünstigt die sinkende Angpt1-Expression Gefäßsprossung, gepaart mit dem NV-induzierenden Zusammenwirken von VEGF und Angpt2. Der dadurch vorliegende angiogene Phänotyp der tgSphk2 Mäuse artet unter diesen pathologischen Bedingungen aus und führt zu unkontrolliertem und chaotischem Gefäßwachstum.

Dagegen zeigten die Sphk2^{-/-} Tiere keine Veränderung in der VO, aber eine deutlich verlangsamte und gestörte NV mit auffälliger Mangelexpression sowohl in den Rezeptoren als auch in vaskulären Wachstumsfaktoren. Die Expression von S1PR1 stieg zwar in diesen Mäusen zum letzten Beobachtungstag hin an, was jedoch zu einer Inhibition des VEGFR Signalisierung führt, die eventuell auf eine Rezeptortransaktivierung durch die hohen plasmatischen S1P-Level zurückzuführen ist, da VEGF selbst in diesen Mäusen kaum exprimiert wird. Allgemein könnte der Mangel aller wichtigen Faktoren, die die Bildung neuer Blutgefäße regulieren, wie VEGF, Angpt1, Angpt2 und die S1PRs, zu den spärlich und fehlerhaft gebildeten Gefäßen führen, die bei diesen Mäusen im Krankheitsmodell aufgefunden wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein bedeutender Einfluss des S1P produzierenden Enzyms Sphk2 auf physiologische und pathologische Angiogenese gezeigt werden, was die wichtige Rolle der Sphk2/S1P/S1PRs Achse unterstreicht und die pleiotropen Effekte von S1P hervorhebt. Global betrachtet bewirkte ein Übermaß an Sphk2 ein Ausarten des Blutgefäßwachstums, während ein Mangel an Sphk2 zu spärlichem und fehlerhaften Blutgefäßwachstum führte. Demensprechend könnte ein Zeitpunkt spezifisches Eingreifen in die Sphk2/S1P/S1PR Achse mittels pharmakologischer Inhibitoren ein vielversprechender Angriffspunkt zur therapeutischen Behandlung von gefäßproliferativen Netzhauterkrankungen, wie der ROP, darstellen.

6. Summary

Pathological blood vessel growth is a major cause of blindness in ischemic retinopathies, a diverse group of retinal diseases, including retinopathy of prematurity (ROP), in which ischemia or vessel occlusion leads to retinal hypoxia and neovascularization (NV).

The hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) is the predominant growth factor associated with pathological angiogenesis. Other important angiogenic factors are angiopoietin 1 (Angpt1) and angiopoietin 2 (Angpt2) with their tyrosine kinase receptor 2 (Tie2). Angpt1/Tie1 binding stimulates vessel stabilization, while Angpt2 acts as an antagonist, leading to vessel destabilization and act in concert with VEGF.

Sphingolipids are structural membrane components which also act as intra- and extracellular messengers. Especially, the bioactive sphingosine-1-phosphate (S1P) is known for its regulation of various cellular process, such as proliferation, cell survival and angiogenesis. S1P mainly exerts its biological effects via five receptors (S1PR1-5) and is catalysed by two ubiquitous expressed sphingosine kinases (Sphk1 and Sphk2), which differ in their subcellular localisations and tissue expressions. Recent studies established the S1P/S1PR1 signalling pathway as a prominent signal for inhibition of angiogenesis and a reduction of the signal transduction increases vessel sprouting. Therefore, the S1P catalysing enzyme Sphk2, the prominent isoform in neuronal and retinal tissue, is of great interest and its role in physiological and pathological angiogenesis is the main focus of this study.

For this purpose, two genetically modulated mouse strains were used in the first part of the study. A transgene Sphk2 (tgSphk2) mouse, in which the knockin of the human Sphk2 gene leads to a systemic overexpression of Sphk2, and a Sphk2 knockout (Sphk2^{-/-}) mouse, with a deficient Sphk2 expression. In tgSphk2 mice, an accelerated retinal angiogenesis, based on an S1P gradient with increased S1P concentration in the tissue, without further increased VEGF expression, was found. The reduction in S1PR1 expression together with the change in S1P levels suggest a hyper-sprouting phenotype. In contrast, angiogenesis was slowed down in the Sphk2^{-/-} mice, with increased plasmatic S1P concentrations, due to a compensatory regulation of Sphk1 and dramatic deficiency in the expression of the vascular growth factors and receptors.

In the second part of the study, pathological angiogenesis was analysed in the genetically modified Sphk2 mice, for which the oxygen-induced retinopathy (OIR) model, mimicking the symptoms of ROP, was used. From postnatal (P) day 7 to 12 mice were held in hyperoxia (75% O₂), leading to vaso-obliteration (VO) and regression of already established blood vessels. Upon returning to room air, the retina develops relative hypoxia, which induces NV.

In tgSphk2 mice VO was reduced and NV occurred faster and stronger but with a morphologically chaotic vessel system. This could be not only because of the hyper-sprouting phenotype, but also because of the initial upregulation of S1PR3 expression, leading to the activation of VEGFR and its angiogenic signalling pathway, even without a further increase in VEGF expression compared to the wildtype mice during the course of the OIR model. Furthermore, the decreasing Angpt1 expression benefits vessel sprouting and Angpt2 in cooperation with VEGF promotes NV. This angiogenic phenotype of the tgSphk2 mice leads to accelerated and chaotic blood vessel growth under pathological conditions.

In contrast, the Sphk2^{-/-} mice showed no change in VO, but a significantly decelerated and disrupted NV with deficient expression of receptors as well as vascular growth factors. The higher plasmatic S1P level in these mice could lead to a VEGFR receptor transactivation, as VEGF itself is hardly expressed in these mice. But the increase in S1PR1 expression at the last observation day would lead in turn to an inhibition of the VEGFR signalling. The dramatic deficiency in the expression of all angiogenic factors like VEGF, Angpt1, Angpt2 and the S1PRs, may explain the severely defective vessel regrowth found in these mice in the OIR model.

In the present study, the major impact of the S1P producing enzyme Sphk2 in physiological and pathological angiogenesis was demonstrated, emphasizing the important role of the Sphk2/S1P/S1PRs axis and highlighting the pleiotropic effects of S1P. In general, an overexpression of Sphk2 leads to an accelerated but chaotic blood vessel growth, while Sphk2 deficiency caused sparse and defective blood vessel growth. Therefore, a stage-specific inhibition of the Sphk2/S1P/S1PR axis may offer attractive novel targets and therapeutic potential to treat ischemic retinal diseases, such as ROP.

7. Appendix

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die fünf Stadien der Frühgeborenenretinopathie	3
Abb. 2 Schematische Darstellung der Gefäßneubildung.....	4
Abb. 3 Retinale Gefäßentwicklung.....	5
Abb. 4 Postnatale Entwicklung des Blutgefäßsystems und schematische Darstellung in der Mausretina	5
Abb. 5 Aufbau der adulten Retina mit vaskulärer Versorgung.....	6
Abb. 6 Gefäßverlust und Neovaskularisation im OIR Modell.....	7
Abb. 7 Chemische Struktur von Sphingolipiden	12
Abb. 8 Der Sphingolipidmetabolismus	13
Abb. 9 Das Sphingolipid-Rheostat	14
Abb. 10 S1P Signaltransduktion	16
Abb. 11 Regulation und Signalwege der Sphingosinkinase 1	18
Abb. 12 Regulation und Signalwege der Sphingosinkinase 2	19
Abb. 13 Schematische Darstellung der Signaltransduktion von S1P über seine Rezeptoren	21
Abb. 14 Konstruktion und Durchführung des <i>knockins</i> des humanen Sphingosinkinase 2 Gens.....	32
Abb. 15 Schematische Darstellung des OIR Modells in der Maus	35
Abb. 16 Sauerstoffkammersystem.....	35
Abb. 17 Präparation der Retina aus dem Mauseuge	37
Abb. 18 retinales Flachpräparat.....	38
Abb. 19 Oberfläche der AngioTool Software.....	39
Abb. 20 Beispiel eines Ergebnisses einer <i>branching point</i> Analyse mithilfe der AngioTool Software	39
Abb. 21 Analyse der Vaso-Obliteration (VO)	40
Abb. 22 Computergestützte semiautomatische Quantifizierung der NV	41
Abb. 23 Paraffineinbettungschema.....	42
Abb. 24 Expression der beiden Isoformen der Sphk in der Mausretina.....	49
Abb. 25 Kontrolle des humanen Sphk2 Gen- <i>knockins</i> in der tgSphk2 Maus und des mSphk2 Gen- <i>knockouts</i> in der Sphk2 ^{-/-} Maus	50
Abb. 26 Expression der mSphk1 und der mSphk2 in WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Retinae	51
Abb. 27 Sphk2 Modulation in der retinalen Gefäßentwicklung	52
Abb. 28 Sphk2 Modulation in der retinalen Schichtbildung	53

Abb. 29 Sphingolipidkonzentrationen in der Retina von WT und Sphk2 modulierten Mäusen.....	54
Abb. 30 Sphingolipidkonzentrationen im Plasma von WT und Sphk2 modulierten Mäusen.....	55
Abb. 31 Expression der fünf membranständigen G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptoren während der retinalen Entwicklung	56
Abb. 32 Retinale Expression der S1P-Rezeptoren in WT und Sphk2 modulierten Mäusen.....	57
Abb. 33 VEGF α -Expression in der Retina von WT und Sphk2 modulierten Mäuse.....	58
Abb. 34 Angpt1- und Angpt2-Expression in der Retina von WT und Sphk2 modulierten Mäusen.....	59
Abb. 35 Sphk2 Modulation im OIR Modell beeinflusst Gefäßverlust und NV	61
Abb. 36 Analyse von VO und NV im OIR Modell	62
Abb. 37 mRNA Expression von mSphk1 und mSphk2 in WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen.....	63
Abb. 38 Sphingolipidkonzentrationen in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen.....	64
Abb. 39 Sphingolipidkonzentrationen im Plasma von WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen.....	65
Abb. 40 Expression der S1P-Rezeptoren in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen im OIR Modell	66
Abb. 41 VEGF-Expression in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen im OIR Modell.....	68
Abb. 42 Angpt1- und Angpt2-Expression in der Retina von WT, tgSphk2 und Sphk2 ^{-/-} Mäusen im OIR Modell	69

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Genotypisierungsprimer.....	34
Tabelle 2 Taqman [®] - Reaktionsansatz pro Probe	46

7.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Angpt	Angiopoietin
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CDase	Ceramidase
cDNA	Komplementär-DNA
Cer	Ceramid
CerK	Ceramidkinase
CerKL	CerK-like Protein
CerS	Ceramidsynthase
CIB 1	Calcium- und Integrin-bindendes Protein 1
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrokarbonat behandeltes Wasser
dhS1P	Sphingarin-1-Phosphat (Dihydrosphingosin-1-Phosphat)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
et al	und andere
EtOH	Ethanol

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCase	Glucosylceramidase
GCL	Ganglienzellschicht
GCS	Glucosylceramidsynthase
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GSL	Glykosphingolipide
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histon-Deacetylase
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
Hex	Hexadecenal
hSphk2	Humane Sphingosinkinase 2
IFN	Interferon
IGF	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IL	Interleukin
ILM	Innere limitierende Membran
INL	innere nukleäre Schicht
IPL	innere plexiforme Schicht
IPM	Interphotorezeptormatrix
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Lec	Lectin
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
mSphk2	Murine Sphingosinkinase 2
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBL	Neuroblastenschicht
NF-κB	Nuklearfaktor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen
nm	Nanometer

nmol	Nanomol
NV	Neovaskularisation
OD	optische Dichte
OIR	Sauerstoff-induzierte Retinopathie
OLM	Äußere limitierende Membran
ONL	Äußere nukleare Schicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
P	Postnatal Tag
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	PDGF Rezeptor
PE	Phosphoethanolamin
pH	pons Hydrogenium
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RGC	retinale Ganglienzelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROP	Frühgeborenenretinopathie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P Lyase	Sphingosin-1-Phosphat-Lyase
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SMase	Sphingomyelinase
SMC	glatte Muskelzelle
SMS	Sphingomyelin-Synthase
Sphk	Sphingosinkinase
Sphk2 ^{-/-}	Sphingosinkinase 2 <i>knockout</i>

Spns2	S1P Transporter Spinster2
SPP / SPPase	Sphingosin-1-Phosphat Phosphatase
SPT	Serine-Palmitoyl-Transferase
Tab.	Tabelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TGFbR	TGFb Rezeptor
tgSphk2	Sphingosinkinase 2 überexprimierende Maus
Tie2	Tyrosinkinase-Rezeptor 2
U	Units
U/mg	Units pro mg
V	Volt
VEGFR	VEGF Rezeptor
VEGF α	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor alpha
vgl.	Vergleiche
VO	Vaso-Obliteration / Gefäßverschluss / Gefäßverlust
VO-Zone	Vaso-Obliterationsareal / avaskuläre Zone
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.4 Literaturverzeichnis

- Abou, R., Leung, M., Khidir, M.J.H., Wolterbeek, R., Schali, M.J., Ajmone Marsan, N., Bax, J.J., Delgado, V., 2017. Influence of Aging on Level and Layer-Specific Left Ventricular Longitudinal Strain in Subjects Without Structural Heart Disease. *Am J Cardiol* 120, 2065-2072.
- Abraham, C.E., Miranda, G.E., Agnolazza, D.L., Politi, L.E., Rotstein, N.P., 2010. Synthesis of sphingosine is essential for oxidative stress-induced apoptosis of photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 1171-1180.
- Agarwal, A., Ingham, S.A., Harkins, K.A., Do, D.V., Nguyen, Q.D., 2016. The role of pharmacogenetics and advances in gene therapy in the treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacogenomics* 17, 309-320.
- Aiello, L.P., Pierce, E.A., Foley, E.D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G.L., Smith, L.E., 1995. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10457-10461.
- Akwii, R.G., Sajib, M.S., Zahra, F.T., Mikelis, C.M., 2019. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 8.
- Allende, M.L., Proia, R.L., 2002. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochimica et biophysica acta* 1582, 222-227.
- Allende, M.L., Sasaki, T., Kawai, H., Olivera, A., Mi, Y., van Echten-Deckert, G., Hajdu, R., Rosenbach, M., Keohane, C.A., Mandala, S., Spiegel, S., Proia, R.L., 2004. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *The Journal of biological chemistry* 279, 52487-52492.
- Alvarez, S.E., Milstien, S., Spiegel, S., 2007. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18, 300-307.
- Aoki, M., Aoki, H., Ramanathan, R., Hait, N.C., Takabe, K., 2016. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators of inflammation* 2016, 8606878.
- Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G.D., Isner, J.M., 1998. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation research* 83, 233-240.
- Bandhuvula, P., Saba, J.D., 2007. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends in molecular medicine* 13, 210-217.
- Bartke, N., Hannun, Y.A., 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S91-96.
- Bashinsky, A.L., 2017. Retinopathy of Prematurity. *North Carolina medical journal* 78, 124-128.
- Betito, S., Cuvillier, O., 2006. Regulation by sphingosine 1-phosphate of Bax and Bad activities during apoptosis in a MEK-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications* 340, 1273-1277.

- Bian, G., Yu, C., Liu, L., Fang, C., Chen, K., Ren, P., Zhang, Q., Liu, F., Zhang, K., Xue, Q., Xiang, J., Guo, H., Song, J., Zhao, Y., Wu, W., Chung, S.K., Sun, R., Ju, G., Wang, J., 2018. Sphingosine 1-phosphate stimulates eyelid closure in the developing rat by stimulating EGFR signaling. *Science signaling* 11.
- Blaho, V.A., Hla, T., 2014. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of lipid research* 55, 1596-1608.
- Blein-Nicolas, M., Albertin, W., da Silva, T., Valot, B., Balliau, T., Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., Sicard, D., Dillmann, C., de Vienne, D., Zivy, M., 2015. A Systems Approach to Elucidate Heterosis of Protein Abundances in Yeast. *Mol Cell Proteomics* 14, 2056-2071.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Blondeau, N., Lai, Y., Tyndall, S., Popolo, M., Topalkara, K., Pru, J.K., Zhang, L., Kim, H., Liao, J.K., Ding, K., Waeber, C., 2007. Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain. *Journal of neurochemistry* 103, 509-517.
- Bravo, D., Pardo-Diaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., Leon-Moreno, C., 2018. Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *J Appl Microbiol* 124, 1175-1194.
- Brizuela, L., Rabano, M., Gangoiti, P., Narbona, N., Macarulla, J.M., Trueba, M., Gomez-Munoz, A., 2007. Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways. *Journal of lipid research* 48, 2264-2274.
- Brush, R.S., Tran, J.T., Henry, K.R., McClellan, M.E., Elliott, M.H., Mandal, M.N., 2010. Retinal sphingolipids and their very-long-chain fatty acid-containing species. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 4422-4431.
- Caballero, S., Swaney, J., Moreno, K., Afzal, A., Kielczewski, J., Stoller, G., Cavalli, A., Garland, W., Hansen, G., Sabbadini, R., Grant, M.B., 2009. Anti-sphingosine-1-phosphate monoclonal antibodies inhibit angiogenesis and sub-retinal fibrosis in a murine model of laser-induced choroidal neovascularization. *Experimental eye research* 88, 367-377.
- Campochiaro, P.A., 2015. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Progress in retinal and eye research* 49, 67-81.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.
- Chan, H., Pitson, S.M., 2013. Post-translational regulation of sphingosine kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 147-156.
- Chen, H., Chan, A.Y., Stone, D.U., Mandal, N.A., 2014. Beyond the cherry-red spot: Ocular manifestations of sphingolipid-mediated neurodegenerative and inflammatory disorders. *Survey of ophthalmology* 59, 64-76.
- Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., Green, D.R., 2012. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148, 988-1000.

- Chun, J., Hartung, H.P., 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clinical neuropharmacology* 33, 91-101.
- Connor, K.M., Krah, N.M., Dennison, R.J., Aderman, C.M., Chen, J., Guerin, K.I., Sapieha, P., Stahl, A., Willett, K.L., Smith, L.E., 2009. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nature protocols* 4, 1565-1573.
- Crousillac, S., Colonna, J., McMains, E., Dewey, J.S., Gleason, E., 2009. Sphingosine-1-phosphate elicits receptor-dependent calcium signaling in retinal amacrine cells. *Journal of neurophysiology* 102, 3295-3309.
- Cuvillier, O., Edsall, L., Spiegel, S., 2000. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 15691-15700.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S., 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.
- Dogra, M.R., Katoch, D., Dogra, M., 2017. An Update on Retinopathy of Prematurity (ROP). *Indian journal of pediatrics* 84, 930-936.
- Donati, C., Meacci, E., Nuti, F., Becciolini, L., Farnararo, M., Bruni, P., 2005. Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 449-451.
- Donati, F., Acciarini, R., De Benedittis, I., de la Torre, X., Pirri, D., Prete, M., Stampella, A., Vernucci, E., Botre, F., 2018. Detecting Autologous Blood Transfusion in Doping Control: Biomarkers of Blood Aging and Storage Measured by Flow Cytofluorimetry. *Curr Pharm Biotechnol* 19, 124-135.
- Durham, J.T., Dulmovits, B.M., Cronk, S.M., Sheets, A.R., Herman, I.M., 2015. Pericyte chemomechanics and the angiogenic switch: insights into the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy? *Investigative ophthalmology & visual science* 56, 3441-3459.
- Endo, A., Nagashima, K., Kurose, H., Mochizuki, S., Matsuda, M., Mochizuki, N., 2002. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *The Journal of biological chemistry* 277, 23747-23754.
- Eresch, J., Stumpf, M., Koch, A., Vutukuri, R., Ferreiros, N., Schreiber, Y., Schroder, K., Devraj, K., Popp, R., Hattenbach, L.O., Pfeilschifter, J., Pfeilschifter, W., 2018. Sphingosine Kinase 2 Modulates Retinal Neovascularization in the Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 59, 653-661.
- Fagiani, E., Christofori, G., 2013. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters* 328, 18-26.
- Fang, C., Bian, G., Ren, P., Xiang, J., Song, J., Yu, C., Zhang, Q., Liu, L., Chen, K., Liu, F., Zhang, K., Wu, C., Sun, R., Hu, D., Ju, G., Wang, J., 2018. S1P transporter SPNS2

regulates proper postnatal retinal morphogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32, 3597-3613.

Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N.W., Witzenrath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Sobke, A., Herrmann, M., Preissner, K.T., Vajkoczy, P., Augustin, H.G., 2006. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12, 235-239.

Fischl, A.S., Wang, X., Falcon, B.L., Almonte-Baldonado, R., Bodenmiller, D., Evans, G., Stewart, J., Wilson, T., Hipskind, P., Manro, J., Uhlik, M.T., Chintharlapalli, S., Gerald, D., Alsop, D.C., Benjamin, L.E., Bhatt, R.S., 2019. Inhibition of Sphingosine Phosphate Receptor 1 Signaling Enhances the Efficacy of VEGF Receptor Inhibition. *Molecular cancer therapeutics* 18, 856-867.

Fox, T.E., Han, X., Kelly, S., Merrill, A.H., 2nd, Martin, R.E., Anderson, R.E., Gardner, T.W., Kester, M., 2006. Diabetes alters sphingolipid metabolism in the retina: a potential mechanism of cell death in diabetic retinopathy. *Diabetes* 55, 3573-3580.

Frank, R.N., 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 350, 48-58.

Fruttiger, M., 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 77-88.

Furland, N.E., Oresti, G.M., Antollini, S.S., Venturino, A., Maldonado, E.N., Avelano, M.I., 2007. Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *The Journal of biological chemistry* 282, 18151-18161.

Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Lavina, B., Muhl, L., Hofmann, J.J., Ebarasi, L., Nystrom, S., Rymo, S., Chen, L.L., Pang, M.F., Jin, Y., Raschperger, E., Roswall, P., Schulte, D., Benedito, R., Larsson, J., Hellstrom, M., Fuxe, J., Uhlen, P., Adams, R., Jakobsson, L., Majumdar, A., Vestweber, D., Uv, A., Betsholtz, C., 2012. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Developmental cell* 23, 587-599.

Gandy, K.A., Canals, D., Adada, M., Wada, M., Roddy, P., Snider, A.J., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2013. Sphingosine 1-phosphate induces filopodia formation through S1PR2 activation of ERM proteins. *The Biochemical journal* 449, 661-672.

Garcia-Pacios, M., Collado, M.I., Busto, J.V., Sot, J., Alonso, A., Arrondo, J.L., Goni, F.M., 2009. Sphingosine-1-phosphate as an amphipathic metabolite: its properties in aqueous and membrane environments. *Biophysical journal* 97, 1398-1407.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 161, 1163-1177.

Graler, M.H., Bernhardt, G., Lipp, M., 1998. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53, 164-169.

Hackett, S.F., Ozaki, H., Strauss, R.W., Wahlin, K., Suri, C., Maisonpierre, P., Yancopoulos, G., Campochiaro, P.A., 2000. Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *Journal of cellular physiology* 184, 275-284.

Hackett, S.F., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Campochiaro, P.A., 2002. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *Journal of cellular physiology* 192, 182-187.

- Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2009. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, N.Y.)* 325, 1254-1257.
- Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S., 2006. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 2016-2026.
- Hammes, H.P., Feng, Y., Pfister, F., Brownlee, M., 2011. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes* 60, 9-16.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Bell, R.M., 1986. Protein kinase C activation in mixed micelles. Mechanistic implications of phospholipid, diacylglycerol, and calcium interdependencies. *The Journal of biological chemistry* 261, 7184-7190.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 139-150.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2018. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, 175-191.
- Hansen, T.M., Singh, H., Tahir, T.A., Brindle, N.P., 2010. Effects of angiopoietins-1 and -2 on the receptor tyrosine kinase Tie2 are differentially regulated at the endothelial cell surface. *Cellular signalling* 22, 527-532.
- Harada, J., Foley, M., Moskowitz, M.A., Waeber, C., 2004. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *Journal of neurochemistry* 88, 1026-1039.
- Heavner, W., Pevny, L., 2012. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Hellstrom, A., Smith, L.E., Dammann, O., 2013. Retinopathy of prematurity. *Lancet* 382, 1445-1457.
- Hla, T., 2004. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Seminars in cell & developmental biology* 15, 513-520.
- Hla, T., 2005. Genomic insights into mediator lipidomics. *Prostaglandins & other lipid mediators* 77, 197-209.
- Hla, T., Venkataraman, K., Michaud, J., 2008. The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochimica et biophysica acta* 1781, 477-482.
- Hofmann, L.P., Ren, S., Schwalm, S., Pfeilschifter, J., Huwiler, A., 2008. Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner. *Biological chemistry* 389, 1399-1407.
- Holmstrom, G.E., Hellstrom, A., Jakobsson, P.G., Lundgren, P., Tornqvist, K., Wallin, A., 2012. Swedish national register for retinopathy of prematurity (SWEDROP) and the evaluation of screening in Sweden. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 130, 1418-1424.
- Hu, B., Cheng, S.Y., 2009. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 11, 111-116.

- Huang, Y.Q., Li, J.J., Hu, L., Lee, M., Karpatkin, S., 2002. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 99, 1646-1650.
- Igarashi, J., Erwin, P.A., Dantas, A.P., Chen, H., Michel, T., 2003a. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10664-10669.
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., Nakamura, S., 2003b. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* 278, 46832-46839.
- Im, D.S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G.J., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S.R., Lynch, K.R., 2000. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *The Journal of biological chemistry* 275, 14281-14286.
- Itagaki, K., Hauser, C.J., 2003. Sphingosine 1-phosphate, a diffusible calcium influx factor mediating store-operated calcium entry. *The Journal of biological chemistry* 278, 27540-27547.
- Jang, S., Lee, J.H., Choi, K.R., Kim, D., Yoo, H.S., Oh, S., 2007. Cytochemical alterations in the rat retina by LPS administration. *Neurochemical research* 32, 1-10.
- Jin, F., Hagemann, N., Sun, L., Wu, J., Doeppner, T.R., Dai, Y., Hermann, D.M., 2018. High-density lipoprotein (HDL) promotes angiogenesis via S1P3-dependent VEGFR2 activation. *Angiogenesis* 21, 381-394.
- Joussen, A.M., 2007. [Molecular pathogenesis of ocular vascular disease--anti-angiogenesis as a therapeutic concept]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 132, 1268-1272.
- Jung, B., Obinata, H., Galvani, S., Mendelson, K., Ding, B.S., Skoura, A., Kinzel, B., Brinkmann, V., Rafii, S., Evans, T., Hla, T., 2012. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Developmental cell* 23, 600-610.
- Kawabori, M., Kacimi, R., Karliner, J.S., Yenari, M.A., 2013. Sphingolipids in cardiovascular and cerebrovascular systems: Pathological implications and potential therapeutic targets. *World Journal of Cardiology* 5, 75-86.
- Kehrl, J.H., Hwang, I.Y., Park, C., 2009. Chemoattract receptor signaling and its role in lymphocyte motility and trafficking. *Current topics in microbiology and immunology* 334, 107-127.
- Kelly, B.D., Hackett, S.F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P.A., Semenza, G.L., 2003. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circulation research* 93, 1074-1081.
- Kharel, Y., Morris, E.A., Congdon, M.D., Thorpe, S.B., Tomsig, J.L., Santos, W.L., Lynch, K.R., 2015. Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 355, 23-31.
- Kim, I., Kim, H.G., So, J.N., Kim, J.H., Kwak, H.J., Koh, G.Y., 2000a. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circulation research* 86, 24-29.

- Kim, I., Kim, J.H., Moon, S.O., Kwak, H.J., Kim, N.G., Koh, G.Y., 2000b. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* 19, 4549-4552.
- Kim, R.H., Takabe, K., Milstien, S., Spiegel, S., 2009. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 692-696.
- Kolesnick, R.N., Goni, F.M., Alonso, A., 2000. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *Journal of cellular physiology* 184, 285-300.
- Kono, M., Mi, Y., Liu, Y., Sasaki, T., Allende, M.L., Wu, Y.P., Yamashita, T., Proia, R.L., 2004. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 279, 29367-29373.
- Korn, C., Augustin, H.G., 2015. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Developmental cell* 34, 5-17.
- Krohne, T.U., Muller, A., Larsen, P.P., Holz, F.G., 2018. [Long-term effects of anti-VEGF therapy for retinopathy of prematurity]. *Ophthalmologie* 115, 464-468.
- Lange, C., Ehlken, C., Stahl, A., Martin, G., Hansen, L., Agostini, H.T., 2009. Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247, 1205-1211.
- Lebman, D.A., Spiegel, S., 2008. Cross-talk at the crossroads of sphingosine-1-phosphate, growth factors, and cytokine signaling. *Journal of lipid research* 49, 1388-1394.
- Leclercq, T.M., Pitson, S.M., 2006. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB Life* 58, 467-472.
- Lee, H.J., Cho, C.H., Hwang, S.J., Choi, H.H., Kim, K.T., Ahn, S.Y., Kim, J.H., Oh, J.L., Lee, G.M., Koh, G.Y., 2004. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1200-1208.
- Lem, J., Krasnoperova, N.V., Calvert, P.D., Kosaras, B., Cameron, D.A., Nicolo, M., Makino, C.L., Sidman, R.L., 1999. Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 736-741.
- Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S., 2000a. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *The Journal of biological chemistry* 275, 19513-19520.
- Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S.K., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S., 2003. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278, 40330-40336.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.S., Lee, M.J., Liu, C.H., Hla, T., Spiegel, S., Proia, R.L., 2000b. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *The Journal of clinical investigation* 106, 951-961.

- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., Jr., Milstien, S., Spiegel, S., 2005. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* 280, 37118-37129.
- Maines, L.W., French, K.J., Wolpert, E.B., Antonetti, D.A., Smith, C.D., 2006. Pharmacologic manipulation of sphingosine kinase in retinal endothelial cells: implications for angiogenic ocular diseases. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 5022-5031.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 277, 55-60.
- Mandon, E.C., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., Sandhoff, K., 1992. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *The Journal of biological chemistry* 267, 11144-11148.
- McGiffert, C., Contos, J.J., Friedman, B., Chun, J., 2002. Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis. *FEBS letters* 531, 103-108.
- McGuire, P.G., Rangasamy, S., Maestas, J., Das, A., 2011. Pericyte-derived sphingosine 1-phosphate induces the expression of adhesion proteins and modulates the retinal endothelial cell barrier. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, e107-115.
- Meacci, E., Nuti, F., Donati, C., Cencetti, F., Farnararo, M., Bruni, P., 2008. Sphingosine kinase activity is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Journal of cellular physiology* 214, 210-220.
- Mendelson, K., Evans, T., Hla, T., 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development (Cambridge, England)* 141, 5-9.
- Merrill, A.H., Jr., 2002. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 25843-25846.
- Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J.H., Tigyi, G., Jakobs, K.H., 2003. Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS letters* 554, 443-449.
- Miranda, G.E., Abrahan, C.E., Politi, L.E., Rotstein, N.P., 2009. Sphingosine-1-phosphate is a key regulator of proliferation and differentiation in retina photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science* 50, 4416-4428.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., Proia, R.L., 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Molecular and cellular biology* 25, 11113-11121.
- Mohammed, S., Harikumar, K.B., 2017. Sphingosine 1-Phosphate: A Novel Target for Lung Disorders. *Frontiers in immunology* 8, 296.
- Nagata, Y., Partridge, T.A., Matsuda, R., Zammit, P.S., 2006. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *The Journal of cell biology* 174, 245-253.

- Nambu, H., Nambu, R., Oshima, Y., Hackett, S.F., Okoye, G., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Zack, D.J., Campochiaro, P.A., 2004. Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier. *Gene Ther* 11, 865-873.
- Neubauer, H.A., Pitson, S.M., 2013. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *The FEBS journal* 280, 5317-5336.
- O'Sullivan, C., Schubart, A., Mir, A.K., Dev, K.K., 2016. The dual S1PR1/S1PR5 drug BAF312 (Siponimod) attenuates demyelination in organotypic slice cultures. *Journal of neuroinflammation* 13, 31.
- Obinata, H., Hla, T., 2012. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Seminars in immunopathology* 34, 73-91.
- Okada, T., Ding, G., Sonoda, H., Kajimoto, T., Haga, Y., Khosrowbeygi, A., Gao, S., Miwa, N., Jahangeer, S., Nakamura, S., 2005. Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 36318-36325.
- Okada, T., Kajimoto, T., Jahangeer, S., Nakamura, S., 2009. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system. *Cellular signalling* 21, 7-13.
- Oshima, Y., Oshima, S., Nambu, H., Kachi, S., Takahashi, K., Umeda, N., Shen, J., Dong, A., Apte, R.S., Duh, E., Hackett, S.F., Okoye, G., Ishibashi, K., Handa, J., Melia, M., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Zack, D.J., Campochiaro, P.A., 2005. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 963-965.
- Ozaki, H., Hayashi, H., Viores, S.A., Moromizato, Y., Campochiaro, P.A., Oshima, K., 1997. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Experimental eye research* 64, 505-517.
- Pierce, E.A., Avery, R.L., Foley, E.D., Aiello, L.P., Smith, L.E., 1995. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 905-909.
- Pitson, S.M., 2011. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends in biochemical sciences* 36, 97-107.
- Pitson, S.M., D'Andrea R, J., Vandeleur, L., Moretti, P.A., Xia, P., Gamble, J.R., Vadas, M.A., Wattenberg, B.W., 2000. Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *The Biochemical journal* 350 Pt 2, 429-441.
- Politi, L.E., Rotstein, N.P., Carri, N.G., 2001. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Investigative ophthalmology & visual science* 42, 3008-3015.
- Porter, H., Qi, H., Prabhu, N., Gramberg, R., McRae, J., Hopiavuori, B., Mandal, N., 2018. Characterizing Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors in the Mammalian Eye and Retina. *Int J Mol Sci* 19.

- Proia, R.L., Hla, T., 2015. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *The Journal of clinical investigation* 125, 1379-1387.
- Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D.C., Merrill, A.H., Jr., 2008. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *Journal of lipid research* 49, 1621-1639.
- Qiao, Y., Hu, R., Wang, Q., Qi, J., Yang, Y., Kijlstra, A., Yang, P., 2012. Sphingosine 1-phosphate elicits proinflammatory responses in ARPE-19 cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 53, 8200-8207.
- Ranty, M.L., Carpentier, S., Cournot, M., Rico-Lattes, I., Malecaze, F., Levade, T., Delisle, M.B., Quintyn, J.C., 2009. Ceramide production associated with retinal apoptosis after retinal detachment. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247, 215-224.
- Reichenbach, A., Bringmann, A., 2013. New functions of Muller cells. *Glia* 61, 651-678.
- Rotstein, N.P., Miranda, G.E., Abraham, C.E., German, O.L., 2010. Regulating survival and development in the retina: key roles for simple sphingolipids. *Journal of lipid research* 51, 1247-1262.
- Saba, J.D., Hla, T., 2004. Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circulation research* 94, 724-734.
- Saini, H.S., Coelho, R.P., Goparaju, S.K., Jolly, P.S., Maceyka, M., Spiegel, S., Sato-Bigbee, C., 2005. Novel role of sphingosine kinase 1 as a mediator of neurotrophin-3 action in oligodendrocyte progenitors. *Journal of neurochemistry* 95, 1298-1310.
- Saint-Geniez, M., D'Amore, P.A., 2004. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 48, 1045-1058.
- Sanyal, S., De Ruiter, A., Hawkins, R.K., 1980. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. *The Journal of comparative neurology* 194, 193-207.
- Sasaki, H., Arai, H., Cocco, M.J., White, S.H., 2009. pH dependence of sphingosine aggregation. *Biophysical journal* 96, 2727-2733.
- Sato, T., Wada, K., Arahori, H., Kuno, N., Imoto, K., Iwahashi-Shima, C., Kusaka, S., 2012. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 153, 327-333.e321.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., Qin, Y., 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376, 70-74.
- Schelenz, D., Kleiter, I., Schollhammer, J., Rehrmann, J., Elling, M., Dick, H.B., Kakkassery, V., 2018. [Early onset of fingolimod-associated macular edema]. *Ophthalmologie* 115, 424-428.
- Schwalm, S., Beyer, S., Frey, H., Haceni, R., Grammatikos, G., Thomas, D., Geisslinger, G., Schaefer, L., Huwiler, A., Pfeilschifter, J., 2017. Sphingosine Kinase-2 Deficiency Ameliorates Kidney Fibrosis by Up-Regulating Smad7 in a Mouse Model of Unilateral Ureteral Obstruction. *The American journal of pathology* 187, 2413-2429.
- Schwalm, S., Pfeilschifter, J., Huwiler, A., 2013. Sphingosine-1-phosphate: a Janus-faced mediator of fibrotic diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 239-250.

- Schwalm, S., Timcheva, T.M., Filipenko, I., Ebadi, M., Hofmann, L.P., Zangemeister-Wittke, U., Pfeilschifter, J., Huwiler, A., 2015. Sphingosine kinase 2 deficiency increases proliferation and migration of renal mouse mesangial cells and fibroblasts. *Biological chemistry* 396, 813-825.
- Sensken, S.C., Bode, C., Nagarajan, M., Peest, U., Pabst, O., Graler, M.H., 2010. Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 184, 4133-4142.
- Simon, M.V., Prado Spalm, F.H., Politi, L.E., Rotstein, N.P., 2015. Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Muller Glial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 56, 5808-5815.
- Simon, M.V., Prado Spalm, F.H., Vera, M.S., Rotstein, N.P., 2019. Sphingolipids as Emerging Mediators in Retina Degeneration. *Front Cell Neurosci* 13, 246.
- Skeie, J.M., Tsang, S.H., Mahajan, V.B., 2011. Evisceration of mouse vitreous and retina for proteomic analyses. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Skoura, A., Sanchez, T., Claffey, K., Mandala, S.M., Proia, R.L., Hla, T., 2007. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *The Journal of clinical investigation* 117, 2506-2516.
- Snider, A.J., Orr Gandy, K.A., Obeid, L.M., 2010. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. *Biochimie* 92, 707-715.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *The Journal of biological chemistry* 277, 25851-25854.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 397-407.
- Sprong, H., Degroote, S., Nilsson, T., Kawakita, M., Ishida, N., van der Sluijs, P., van Meer, G., 2003. Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* 14, 3482-3493.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., Hua, J., Lofqvist, C., Hellstrom, A., Smith, L.E., 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 2813-2826.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Willett, K.L., Krah, N.M., Dennison, R.J., Chen, J., Guerin, K.I., Smith, L.E., 2009. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis* 12, 297-301.
- Stahl, A., Gopel, W., 2015. Screening and Treatment in Retinopathy of Prematurity. *Dtsch Arztebl Int* 112, 730-735.
- Stahl, A., Lagreze, W.A., Agostini, H.T., 2012. [Pathogenesis of retinopathy of prematurity]. *Ophthalmologie* 109, 1174-1181.
- Stiles, M., Qi, H., Sun, E., Tan, J., Porter, H., Allegood, J., Chalfant, C.E., Yasumura, D., Matthes, M.T., LaVail, M.M., Mandal, N.A., 2016. Sphingolipid profile alters in retinal dystrophic P23H-1 rats and systemic FTY720 can delay retinal degeneration. *Journal of lipid research* 57, 818-831.

- Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., Keshet, E., 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 4738-4747.
- Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S., Spiegel, S., 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Advances in experimental medicine and biology* 688, 141-155.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180.
- Swaney, J.S., Moreno, K.M., Gentile, A.M., Sabbadini, R.A., Stoller, G.L., 2008. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a novel fibrotic mediator in the eye. *Experimental eye research* 87, 367-375.
- Takabe, K., Spiegel, S., 2014. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. *Journal of lipid research* 55, 1839-1846.
- Tanimoto, T., Jin, Z.G., Berk, B.C., 2002. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *The Journal of biological chemistry* 277, 42997-43001.
- Terao, R., Honjo, M., Aihara, M., 2017. Apolipoprotein M Inhibits Angiogenic and Inflammatory Response by Sphingosine 1-Phosphate on Retinal Pigment Epithelium Cells. *Int J Mol Sci* 19.
- Thurston, G., 2002. Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat* 200, 575-580.
- Tirodkar, T.S., Voelkel-Johnson, C., 2012. Sphingolipids in apoptosis. *Experimental oncology* 34, 231-242.
- Uemura, A., Kusuhara, S., Katsuta, H., Nishikawa, S., 2006. Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation. *Experimental cell research* 312, 676-683.
- Van Brocklyn, J.R., Jackson, C.A., Pearl, D.K., Kotur, M.S., Snyder, P.J., Prior, T.W., 2005. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64, 695-705.
- Venkataraman, K., Lee, Y.M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C., Hla, T., 2008. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circulation research* 102, 669-676.
- Vessey, K.A., Wilkinson-Berka, J.L., Fletcher, E.L., 2011. Characterization of retinal function and glial cell response in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *The Journal of comparative neurology* 519, 506-527.
- Walz, J.M., Bemme, S., Reichl, S., Akman, S., Breuss, H., Susskind, D., Glitz, B., Muller, V.C., Wagenfeld, L., Gabel-Pfisterer, A., Aisenbrey, S., Engelmann, K., Koutsonas, A., Krohne, T.U., Stahl, A., 2018. [Treated cases of retinopathy of prematurity in Germany : 5-year data from the Retina.net ROP registry]. *Ophthalmologe* 115, 476-488.

- Wang, Q., Lash, G.E., 2017. Angiopoietin 2 in placentation and tumor biology: The yin and yang of vascular biology. *Placenta* 56, 73-78.
- Wattenberg, B.W., 2010. Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World journal of biological chemistry* 1, 362-368.
- Wijesinghe, D.S., Massiello, A., Subramanian, P., Szulc, Z., Bielawska, A., Chalfant, C.E., 2005. Substrate specificity of human ceramide kinase. *Journal of lipid research* 46, 2706-2716.
- Wu, W.C., Kuo, H.K., Yeh, P.T., Yang, C.M., Lai, C.C., Chen, S.N., 2013. An updated study of the use of bevacizumab in the treatment of patients with prethreshold retinopathy of prematurity in taiwan. *Am J Ophthalmol* 155, 150-158.e151.
- Wu, Y.P., Mizugishi, K., Bektas, M., Sandhoff, R., Proia, R.L., 2008. Sphingosine kinase 1/S1P receptor signaling axis controls glial proliferation in mice with Sandhoff disease. *Human molecular genetics* 17, 2257-2264.
- Xie, B., Shen, J., Dong, A., Rashid, A., Stoller, G., Campochiaro, P.A., 2009. Blockade of sphingosine-1-phosphate reduces macrophage influx and retinal and choroidal neovascularization. *Journal of cellular physiology* 218, 192-198.
- Yamada, H., Yamada, E., Hackett, S.F., Ozaki, H., Okamoto, N., Campochiaro, P.A., 1999. Hyperoxia causes decreased expression of vascular endothelial growth factor and endothelial cell apoptosis in adult retina. *Journal of cellular physiology* 179, 149-156.
- Yao, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Pestell, R., Edelstein, D., Giardino, I., Suske, G., Rabbani, N., Thornalley, P.J., Sarthy, V.P., Hammes, H.P., Brownlee, M., 2007. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *The Journal of biological chemistry* 282, 31038-31045.
- Ye, X., Wang, Y., Nathans, J., 2010. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends in molecular medicine* 16, 417-425.
- Young, K.W., Nahorski, S.R., 2002. Sphingosine 1-phosphate: a Ca²⁺ release mediator in the balance. *Cell calcium* 32, 335-341.
- Zemann, B., Kinzel, B., Muller, M., Reuschel, R., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Bornancin, F., Baumruker, T., Billich, A., 2006. Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 107, 1454-1458.
- Zhang, H., Desai, N.N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G., Spiegel, S., 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The Journal of cell biology* 114, 155-167.
- Zhu, D., Sreekumar, P.G., Hinton, D.R., Kannan, R., 2010. Expression and regulation of enzymes in the ceramide metabolic pathway in human retinal pigment epithelial cells and their relevance to retinal degeneration. *Vision research* 50, 643-651.
- Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., Vermeren, S., 2011. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PloS one* 6, e27385.

7.5 Publikationen

7.5.1 Publikationen aus dieser Arbeit

Eresch J, Stumpf M, Koch A, Vutukuri R, Ferreirós N, Schreiber Y, Schröder K, Devraj K, Popp R, Huwiler A, Hattenbach LO, Pfeilschifter J, Pfeilschifter W. Sphingosine kinase 2 modulates retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59:653–661.

Christophel J, Hattenbach LO, Pfeilschifter J, Pfeilschifter W. Sphingosine kinase 2 induces angiogenic effects by enhancing neovascularisation in the mouse model of retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016; Vol.57; E-Abstract:3187

7.5.2 Sonstige Publikationen

Brandes RP, Harenkamp S, Schürmann C, Josipovic I, Rashid B, Rezende F, Löwe O, Moll F, Epah J, **Eresch J**, Nayak A, Kopaliani I, Penski C, Mittelbronn M, Weissmann N, Schröder K. The Cytosolic NADPH Oxidase Subunit NoxO1 Promotes an Endothelial Stalk Cell Phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36:1558-1565.

Thangaraj G, **Christophel J**, Bachmann G, Greif A, Layer PG. PEDF counteracts DL- α -amino adipate toxicity and rescues gliotoxic damages in RPE-free chicken retinal explants. Exp Eye Res. 2015 May;134:111-22.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. Josef Pfeilschifter und Prof. Dr. Waltraud Pfeilschifter nicht nur für die Möglichkeit meine Promotion bei Ihnen anzufertigen bedanken, sondern auch für die hervorragende Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Insbesondere Waltraud bin ich für die direkte Betreuung, die vielen beruflichen wie privaten Gespräche, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft in jeglichen Belangen und die wissenschaftlichen Diskussionen sehr dankbar.

Bei Prof. Dr. Beatrix Süß möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachten, der Hilfsbereitschaft während meiner Promotion und das wertvolle Feedback zu meiner Arbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. Lars-Olof Hattenbach möchte ich mich für die Kooperation in diesem Projekt, die anregenden Diskussionen, die Bereitstellung seines fundierten ophthalmologischen Wissens und die Unterstützung bedanken.

Bei Prof. Dr. Paul Layer und Prof. Dr. Bodo Laube möchte ich mich für ihre Bereitschaft der Prüfungsübernahme bedanken.

Weiterhin möchte ich bei Prof. Dr. Heiko Mühl und Prof. Dr. Stefan Frank und ihren Arbeitsgruppen für die großzügige Bereitstellung des Laborplatzes bedanken. Hierbei gilt ein besonderer Dank PD Dr. Itamar Goren und PD Dr. Malte Bachmann die immer mit Rat und Tat zur Seite standen und die Arbeit im Labor zu einer Freude machten.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Nerea Ferreirós Bouzas und Yannick Schreiber für die Unterstützung bezüglich LCMS/MS, die bei jeglichen Fragen zur Verfügung standen und hervorragende Ergebnisse lieferten.

Besonders möchte ich mich bei Susanne Wienstroer und dem gesamten Team der *core facility* des *vascular research centres* bedanken, ohne die das Arbeiten mit den Tieren nicht möglich gewesen wäre. Dabei geht ein besonderer Dank an Prof. Dr. Katrin Schröder, die wertvolles Feedback zu meiner Arbeit gab und Dr. Rüdiger Popp und Dr. Jiong Hu die mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn an den Hypoxiekammern wieder etwas nicht funktionierte.

A special thanks to my wonderful colleague Rajkumar Vutukuri, from whom I not only learned a lot, but who also supported me a lot and helped whenever help was needed. My PhD time wouldn't have been the same without him. Thank you.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Pfeilschifter möchte ich mich für die theoretische und praktische Unterstützung bedanken, ebenso wie den Mitgliedern der Neuro-AG und Martin Stumpf. Auch möchte ich mich bei dem gesamten Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung während meiner Zeit dort bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Firma Novartis, der Goethe Universität Frankfurt, der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und dem SFB bedanken, ohne die dieses Projekt nicht zustande gekommen wäre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in der gesamten Zeit unterstützt haben, mir immer beiseite standen und ohne die ich nicht so weit gekommen wäre. Ebenso wie meiner besten Freundin und Schwester im Geiste, sie weiß schon warum.

Ganz besonders möchte ich jedoch meinem Mann danken, der viel in den letzten Jahren ausgehalten hat, von durchgearbeitet Wochenenden, über Frustrationen und Schimpftiraden bis hin zur totalen geistigen Abwesenheit. Danke Schatz, dass du immer für mich da warst ohne dich hätte ich das hier sicher nicht geschafft.

9. Lebenslauf

Name: Jeanette Jenny Eresch, geb. Christophel
Geburtsdaten: 27.06.1986 in Heidelberg
Adresse: Am Burgacker 5
69488 Birkenau
Telefon: 06201 186333
E-Mail: jeanette.eresch@gmx.de

Ausbildung und beruflicher Werdegang

06/2013 – 12/2019 **Naturwissenschaftliche Doktorandin** am Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter / Prof. Dr. Waltraud Pfeilschifter

09/2011 – 07/2012 **Diplomarbeit** im Institut für Zoologie, TU Darmstadt
Arbeitsgruppe: Entwicklungsbiologie und Neurogenetik (Prof. Dr. Layer)

10/2006 – 12/2012 **Diplomstudiengang Biologie** an der TU Darmstadt
Diplomabschluss: 04/12/2012

Schulischer Werdegang

09/1997 – 06/2006 Gymnasium Neckargemünd
Abschluss: Abitur 23/06/2006

09/1993 – 07/1997 Grundschule Mauer

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den